

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: BIOCHEMIE

Studijní obor: BIOCHEMIE



Studium metabolismu dihydromyricetinu

The Study of metabolism of dihydromyricetin

Diplomová práce

Bc. Tomáš Blecha

Vedoucí práce: RNDr. Michaela Moserová, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod odborným vedením RNDr. Michaely Moserové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 14. 8. 2017

.....

Tomáš Blecha

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval své vedoucí diplomové práce RNDr. Michaelle Moserové, Ph.D. za zadání velmi zajímavého tématu, odborné vedení a laskavý a trpělivý přístup při vypracování této diplomové práce.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Radku Indrovi, Ph.D. a RNDr. Ivetě Mrízové, Ph.D. za objasnění experimentálních přístupů, odborné rady a trpělivost. Závěrem bych rád poděkoval i své rodině, která mě podporovala během celého mého studia.

Abstrakt

V poslední době je věnována stále větší pozornost chemopreventivním sloučeninám, které běžně přijímáme v rostlinné stravě. Velkou skupinu chemopreventivních sloučenin představují flavonoidy, které jsou obsaženy v mnoha potravinových doplncích. Jedním ze zástupců této skupiny je dihydromyricetin, kterému jsou přisuzovány pozitivní účinky na lidský organismus, především antioxidační, protizánětlivé a hepatoprotektivní. Některé flavonoidy mohou působit jako modulátory enzymů první a druhé fáze metabolismu cizorodých látek a jejich inhibicí či indukci mohou zasáhnout do endogenního metabolismu.

V první části předkládané diplomové práce byl studován vliv flavonoidních sloučenin biochaninu A, dihydromyricetinu, myricetinu a jejich kombinací na expresi cytochromu P450 2E1 (CYP2E1) a sulfotransferasy 1A1 (SULT1A1) v játrech a tenkém střevě laboratorního potkana. Tenké střevo bylo rozděleno na tři části, a to proximální, střední a distální. Nejprve byla provedena izolace celkové RNA, která byla převedena do cDNA za účasti náhodných hexamerů jako primerů. Pomocí kvantitativní PCR bylo zjištěno významné snížení exprese obou enzymů v játrech. K nejvýraznějšímu zvýšení hladiny mRNA dochází u obou enzymů v proximální části tenkého střeva všech premedikovaných potkanů. Exprese CYP2E1 byla signifikantně zvýšena ve střední části tenkého střeva všech premedikovaných potkanů, zatímco SULT1A1 byla zvýšena pouze u potkanů premedikovaných myricetinem. Bylo zjištěno, že dochází k významnému snížení genové exprese u obou enzymů v distální části s výjimkou potkanů premedikovaných biochaninem A, kde bylo naopak pozorováno signifikantní zvýšení exprese SULT1A1 v této části tenkého střeva.

Ve druhé části diplomové práce byl studován metabolismus dihydromyricetinu za použití mikrosomálního systému potkanů nepremedikovaných (kontrolních) a potkanů premedikovaných různými induktory cytochromu P450. Následně byl metabolismus této flavonoidní látky studován za použití rekombinantních cytochromů P450 potkana a člověka exprimovaných v hmyzích buňkách (SupersomyTM). Nicméně ve všech studovaných systémech vznikl pouze jeden metabolit, který byl separován pomocí RP-HPLC s detekcí při 290 nm.

Klíčová slova: flavonoidy, cytochromy P450, cytosolární sulfotransferasy, dihydromyricetin, kvantitativní PCR, metabolismus

Abstract

More attention has recently been paid to the chemopreventive compounds contained in food of plant origin. A large group of chemopreventive compounds are represented by flavonoids contained in many dietary supplements. One of the representatives of this group is dihydromyricetin, which is attributed to positive impact on human organism, in particular by its antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective effects. Some flavonoids can act as modulators of enzymes of phase I and phase II metabolism of xenobiotics biotransformation by their inhibition or induction which can cause an interference with endogenous metabolism.

In first part of this present work, the effect of selected flavonoid compounds, such as biochanin A, dihydromyricetin, myricetin and their combinations on the gene expression of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) and sulfotransferases 1A1 (SULT1A1) in liver and small intestine of laboratory rats was studied. The small intestine was divided into three parts namely a proximal, middle and distal. At first, isolation of total RNA was made followed by conversion into cDNA using random hexamers as primers. By real-time PCR a significant decrease in gene expression of both enzymes in liver was found. The highest induction of gene expression was observed for both enzymes in proximal part of small intestine of rats of all treatment groups. Gene expression of CYP2E1 was significant increase in middle part of small intestine of rats of all treatment groups, while SULT1A1 was increased only in rats treated with myricetin. A significant decrease was found in gene expression of both enzymes in distal part except biochanin A treated rats, which significantly increases expression of SULT1A1 in this part of small intestine.

In second part of this work, we studied metabolism of dihydromyricetin by the microsomal systems of rats untreated (control) and treated with various inducers of cytochrome P450. Afterwards, we studied metabolism of this flavonoid compound using rat and human recombinant cytochrome P450 expressed in insect cells (Supersomes™). However, in all studied systems, only one metabolite was observed, separated by RP-HPLC and detected at 290 nm.

Keywords: flavonoids, cytochrome P450, cytosolic sulfotransferases, dihydromyricetin, real-time PCR, metabolism

[In Czech]

OBSAH

OBSAH	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1 ÚVOD	10
1.1 Biotransformace xenobiotik	10
1.1.1 I. fáze biotransformace xenobiotik	12
1.1.2 II. fáze biotransformace xenobiotik	13
1.2 Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO systém).....	15
1.2.1 Cytochromy P450	15
1.2.1.1 Struktura, výskyt a funkce cytochromu P450	16
1.2.1.2 Reakční mechanismus cytochromu P450	18
1.2.1.3 Regulace hladiny cytochromu P450 indukci enzymu	21
1.2.1.4 Regulace hladiny cytochromu P450 inhibicí enzymu	22
1.2.1.5 Cytochrom P450 2E1	22
1.3 Cytosolární sulfotransferasy	24
1.3.1 Sulfotransferasa 1A1	26
1.4 Flavonoidní látky	26
1.4.1 Struktura flavonoidních látek	27
1.4.2 Metabolismus flavonoidních látek	29
1.4.3 Biologické účinky flavonoidních látek	29
1.4.4 Dihydromyricetin	31
1.4.4.1 Interakce dihydromyricetinu s enzymy I. a II. fáze biotransformace.....	33
1.4.5 Myricetin	36
1.4.6 Biochanin A	36
2 Cíl diplomové práce	37
3 Materiál a metody	38
3.1 Použitý materiál a chemikálie	38
3.2 Použité přístroje.....	39
3.3 Metody	40
3.3.1 Premedikce potkanů	40
3.3.2 Izolace RNA	40
3.3.3 Horizontální agarosová elektroforéza	42
3.3.4 Stanovení čistoty a koncentrace RNA	43

3.3.5	Syntéza cDNA-reverzní transkripce	43
3.3.6	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR)	44
3.3.7	Statistické vyhodnocení polymerázové řetězové reakce v reálném čase	47
3.3.8	Stanovení koncentrace proteinu se 4,4'-dikarboxy-2,2' bicinchoninovou kyselinou..	47
3.3.9	Studium metabolismu dihydromyricetinu potkaním mikrosomálním systémem	48
3.3.10	Studium metabolismu dihydromyricetinu rekombinantními cytochromy P450	50
3.3.11	Separace metabolitů dihydromyricetinu pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie na reverzní fázi	51
4	Výsledky	53
4.1	Izolace celkové RNA, stanovení čistoty a koncentrace.....	53
4.2	Relativní kvantifikace mRNA pro SULT1A1 a CYP2E1	57
4.3	Metabolismus dihydromyricetinu potkaním mikrosomálním systémem.....	59
4.3.1	Oxidace dihydromyricetinu potkaním mikrosomálním systémem	59
4.3.2	Redukce dihydromyricetinu potkaním mikrosomálním systémem	62
4.4	Oxidace dihydromyricetinu potkaními a lidskými rekombinantními cytochromy P450 v SupersomechTM	64
4.4.1	Oxidace dihydromyricetinu potkaními rekombinantními cytochromy P450 v Supersomech TM	65
4.4.2	Oxidace dihydromyricetinu lidskými rekombinantními cytochromy P450 v Supersomech TM	66
5	Diskuse	68
6	Shrnutí a závěr	73
	Seznam použité literatury	74

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor)
ADH	alkoholdehydrogenasa
b₅	cytochrom b ₅
b₅RED	NADH:cytochrom b ₅ reduktasa
B[a]P	benzo[a]pyren
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
Bioch A	biochanin A
CAR	jaderný receptor (constitutive androstane receptor)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
C_t	„cycle threshold“
CYP	cytochrom P450
dHMR	dihydromyricetin
Dis	distální část tenkého střeva
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfát
EC	číselný kód enzymu
EDTA	ethylen diamintetraoctová kyselina
FAD	flavinadenindinukleotid
GABA	kyselina γ-aminomáselná (γ-aminobutyric acid)
GIT	gastrointestinální trakt
HNF1α	játerní jaderný faktor (hepatocyte nuclear factor)
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography)
MFO	systém monooxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxygenases)
Mid	střední část tenkého střeva (middle)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
Myr	myricetin
MS	hmotnostní spektroskopie
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
NADP⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaný)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
NADPH-GS	NADPH-generující systém
NAT	arylamin N-acetyltransferasa

NMR	nukleární magnetická rezonance
P450	pigment s maximem absorbance při 450 nm (cytochrom P450)
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PB	fenobarbital
PCN	pregnenolon-16 α -karbonitril
PCR	polymerazová řetězová reakce
PPAR	jaderný receptor (peroxisome proliferator receptor)
P-PST	fenolická sulfotransferasa
Prox	proximální část tenkého střeva
PXR	jaderný receptor (pregnane X receptor)
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RED	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
RH	substrát
RNA	ribonukleová kyselina
ROH	hydroxylovaný produkt
R'OOH	organický peroxid
ROS	reaktivní formy kyslíku
RP-HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RPM	počet otáček za minutu
rRNA	ribosomální RNA
RT-PCR	polymerasová řetězová reakce v reálném čase (real-time polymerase chain reaction)
RXR	jaderný receptor (retinoid X receptor)
SOD	superoxiddismutasa
SULT	sulfotransferasa
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TS-PST	termostabilní sulfotransferasa
UV	ultrafialové záření
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem
λ	vlnová délka

1 ÚVOD

Flavonoidy, jinak také nazývané bioflavonoidy, jsou nejrozšířenější skupinou fenolických sloučenin vyskytujících se v rostlinách, poskytující mnoho chutí a barev v ovoci a zelenině, a jsou tak přirozenou složkou lidské stravy. V současné době vzrůstá zájem společnosti o znalosti týkajících se rostlinných flavonoidních sloučenin, protože jejich konzumace je spojována s prospěšnými účinky na lidské zdraví včetně sníženého výskytu kardiovaskulárních a nádorových onemocnění ^[1]. Nicméně, není zcela potvrzené, že konzumace většího množství potravin bohatých na rostlinné flavonoidní sloučeniny snižuje výskyt nádorových onemocnění. Existují však studie, které naznačují, že příjem potravin obsahující např. resveratrol může ochránit organismus před vznikem rakoviny, zejména plic ^[2]. Některé specifické flavonoidy např. kvercetin a genistein jsou uváděny na trh jako nutriční doplňky, které užívají ve velkých dávkách pacienti postižené rakovinou jako alternativní a doplňkovou léčbu. Na druhou stranu, zdraví jedinci užívají také tyto doplňky ve vyšších dávkách kvůli jejich antioxidačním vlastnostem. Epidemiologické studie zkoumající vliv flavonoidů na lidské zdraví nejsou zcela jednoznačné. Některé studie naznačují pozitivní efekt na lidské zdraví, ale některé dokonce varují před možnými toxickými účinky ^[3].

Navzdory přírodnímu původu flavonoidních sloučenin se stále jedná o látky tělu nevlastní, tzv. xenobiotika, která jsou v organismu metabolizována řadou biotransformačních enzymů. Interakce flavonoidů se systémem cytochromů P450 je považována za důležitou interakci, jelikož některé flavonoidy jsou schopny inhibovat aktivaci určitých karcinogenů, ale zároveň indukovat cytochromy P450, které aktivují jiný typ karcinogenů. Znalost interakcí flavonoidů s multienzymovým systémem cytochromů P450 je velice významná pro pochopení jejich vlivu na lidské zdraví a pro případnou prevenci před karcinogenní aktivitou a změnami metabolismu léčivých a endogenních sloučenin ^[4].

1.1 Biotransformace xenobiotik

Cizorodé látky neboli xenobiotika (řec. *xenos*-cizí, *bios*-živý) jsou sloučeniny označovány za látky tělu nevlastní, s nimiž organismus přichází denně do kontaktu. Jedná se o sloučeniny, které se za normálních podmínek běžně v organismu nevyskytují, nemají žádnou fyziologickou roli, neslouží jako stavební materiál a ani jako zdroj energie ^[5]. Jejich

koncentrace se zvyšuje po přijetí z externího zdroje. Za primární zdroj cizorodých látek je považován chemický průmysl. Zatímco za sekundární zdroj se považují ty oblasti lidské činnosti, kde jsou tyto produkty chemického průmyslu využívány ^[5,6]. Proto je žádoucí, aby organismus tyto látky co nejdříve vyloučil. Soubor procesů, který se podílí na snadném vyloučení xenobiotik z organismu a potlačením jejich toxicity se označuje jako **biotransformace** ^[7].

Xenobiotika se velmi často řadí do skupiny nepolárních látek, které díky své hydrofobicitě snadno prostupují biologickými membránami. Lipofilní povaha může být na druhou stranu také překážkou, a to především pro jejich eliminaci z organismu. Proto je nutné xenobiotika pomocí biotransformačních reakcí metabolizovat na látky polárnější a lépe vylučitelné ^[8].

Za biotransformaci cizorodých látek jsou označovány procesy, které vedou k jejich snadnému vyloučení z organismu nebo potlačení jejich toxicity ^[7]. V případě, že dochází ke snížení toxicity cizorodé látky prostřednictvím biotransformačních reakcí, tak se jedná o její **detoxikaci**. Naopak, když biotransformační reakce vedou k transformaci cizorodé látky na metabolicky toxičtější látku, hovoříme o **aktivaci** (**obrázek 1**, str. 14). Jde především o aktivaci nemutagenních látek na mutageny ^[9]. Tuto úlohu plní v organismech právě biotransformační enzymy, které se vyznačují především širokou substrátovou specifiitou, kde omezená skupina enzymů dokáže metabolizovat velké množství substrátů ^[7]. Nacházejí se u organismů všech vývojových úrovní, tedy v říši prokaryot a eukaryot a dokonce u některých virů ^[10]. Biotransformačními enzymy jsou vybaveni živočichové i bakterie, ale způsob jejich využití je rozdílný, neboť vlivem evoluce v závislosti na svých životních cyklech a požadavcích se u jednotlivých organismů tyto enzymy vyvíjely odlišnými směry. Zatímco bakterie se snaží cizorodé látky využít pro svůj prospěch jako zdroj uhlíku nebo energie, tak vyšší organismy se je snaží naopak eliminovat ^[7,8].

Biotransformační enzymy se vedle metabolismu xenobiotik podílí také na degradaci endogenních substrátů (eubiotik) jako jsou steroidní hormony, vitamíny A a D, žlučové kyseliny, kyselina arachidonová aj ^[11,12]. Způsob degradace xenobiotik nebo eubiotik závisí v první řadě na jejich povaze. V případě, že je látka dostatečně hydrofilní, tak organismus je schopen ji vyloučit, aniž by se musela zúčastnit reakce s enzymy první případně druhé fáze biotransformace. Xenobiotika resp. eubiotika s nízkou hydrofilitou vstupují do biotransformačních reakcí, díky kterým se jejich hydrofilita zvyšuje, a usnadňuje tak jejich

eliminaci z organismu. Nejčastěji se vylučují močí, žlučí, dále pak také dechem, potem nebo se mohou ukládat do vlasů, nehtů, vousů nebo chlupů ^[13,14].

V živočišných organismech probíhá biotransformace cizorodých látek ve dvou fázích. V první fázi tzv. **derivatizační** se do molekuly xenobiotika inkorporuje reaktivní polární skupina nebo dochází k demaskování funkčních skupin v látce již přítomných. Zabudováním funkční skupiny se zvýší hydrofobicita sloučeniny, která bude následně schopná reakce v druhé fázi biotransformace. Tato fáze je označována jako **konjugační**, při které dochází k navázání (konjugaci) endogenních sloučenin na reaktivní funkční skupiny produktů derivatizační fáze za vzniku polárního konjugátu, oproti původně hydrofobní cizorodé látce. Finálním produktem těchto reakcí je ve vodě lépe rozpustný metabolit, který je snáze eliminován z buněk a vyloučen ven z organismu. Většina biotransformačních reakcí probíhá převážně v játrech, ledvinách, gastrointestinálním traktu (GIT) a plicích. V rostlinách probíhá metabolismus cizorodých látek odlišným způsobem než u živočichů. Probíhá ve třech fázích, z nichž první a druhá fáze probíhá na totožném principu jako u živočichů a ve třetí fázi dochází k opětovné konjugaci ^[9,15].

1.1.1 I. fáze biotransformace xenobiotik

V první fázi biotransformace, nazývané též fází derivatizační, dochází ke zvýšení polarity hydrofobní cizorodé látky, což má za následek zvýšení její rozpustnosti a následné reaktivity ^[13]. Toho bývá docíleno především zabudováním funkčních skupin do jeho molekuly (-OH, -COOH, -NH₂) nebo k demaskování funkčních skupin v molekule již přítomných ^[16]. To se děje především třemi způsoby, a to **oxidační**, **redukční** a případně **hydrolytickou** cestou. Oxidační cesta spočívá v inkorporaci kyslíku do hydrofobní molekuly nebo ve ztrátě elektronů (S-oxidace, N-oxidace, C-hydroxylace, N-hydroxylace, deaminace, dealkylace, epoxidace, oxidace alkoholů, aldehydů či dvojných vazby). Zvýšení hydrofility lze také docílit pomocí hydrolytických a redukčních reakcí na některé z funkčních skupin xenobiotika (redukce nitro- a azoskupin) ^[5]. Vzniklý biotransformační metabolit, pokud je tedy dostatečně polární, je eliminován přímo z organismu nebo podléhá následným konjugačním reakcím. Ve výjimečných případech nedochází v organismu k biotransformaci látek, příkladem takové látky je syntetické sladidlo sacharin, který prochází organismem, aniž by podléhal metabolickým reakcím ^[17].

Mezi hlavní enzymy I. fáze biotransformace katalyzující derivatizační reakce xenobiotik patří jak enzymy mikrosomální frakce (subcelulární systém získaný destrukcí endoplazmatického retikula při homogenizaci buněk), tak cytosolu (roztok cytoplasmy s isolačním pufrem). Mezi klíčové oxidační systémy patří **mikrosomální systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO systém) s cytochromem P450 jako terminální oxidasou**. Dalšími oxidačními enzymy jsou peroxidasy, flavínové monooxygenasy (Zieglerův enzym), dioxygenasy, alkoholdehydrogenasa, aldehyddehydrogenasa, epoxidhydroxylasa, katalasa nebo superoxiddismutasa ^[18]. Ty využívají ke své funkci molekulární kyslík a kofaktor, který je schopný tento kyslík aktivovat (např. FAD). Vnášejí do molekuly xenobiotika jeden atom kyslíku z biatomické molekuly, zatímco druhý je redukován na vodu ^[19].

Redukční reakce participující na biotransformaci xenobiotik nejsou tak významné jako reakce oxidační. Mezi redukční enzymy derivatizační fáze patří cytochrom P450 oxidoreduktasa, cytosolární xanthinoxidasa a aldehydoxidasa ^[20].

1.1.2 II. fáze biotransformace xenobiotik

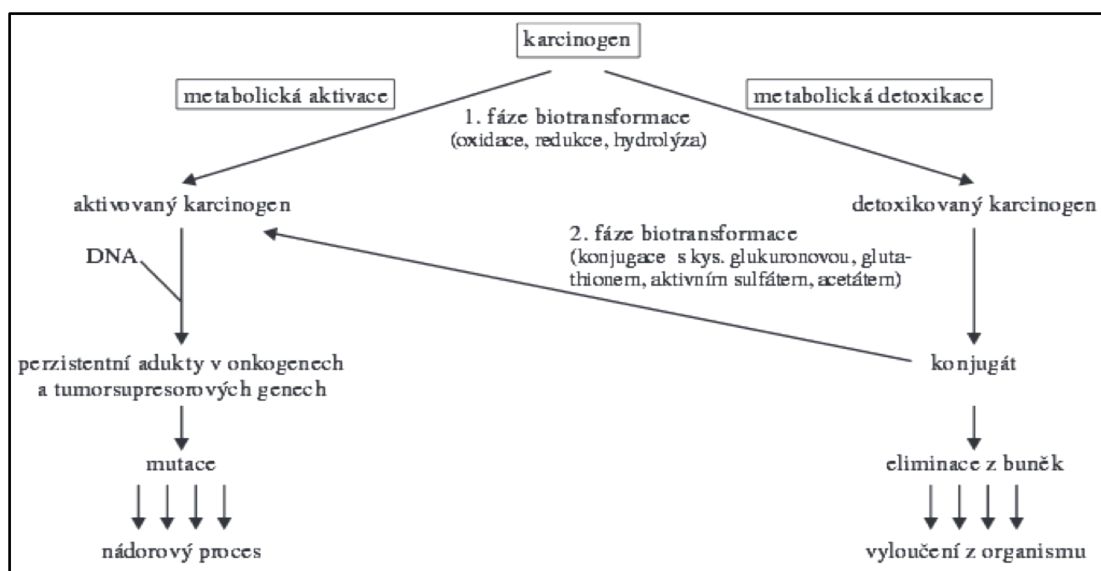
Ve druhé fázi biotransformace, označované jako konjugace, dochází k reakci polárního endogenního substrátu s funkční skupinou xenobiotika o nízké molekulové hmotnosti, která je buď přítomná nebo byla zavedena v derivatizační fázi. Mezi nejdůležitější reakce patří konjugace s aktivním sulfátem, kyselinou glukuronovou, acetátem a aminokyselinami nebo peptidy (taurin, glycin, alanin, cystein, glutathion). Výsledkem je vznik konjugátu, který je v porovnání s původní látkou rozpustnější ve vodě a dostatečně polární na to, aby byl z buněk eliminován a vyloučen z těla převážně v moči či žluči ^[15].

Nejčastější reakcí druhé fáze je konjugace s kyselinou glukuronovou. Tato reakce bývá katalyzována **UDP-glukuronyltransferasou**, kde donorem glukuronátu je UDP-glukuronová kyselina. Vzniklý konjugovaný metabolit (O-glukosiduronát či N-glukosiduronát) může být vyloučen z těla hlavně močí nebo žlučí ^[21].

Další významnou reakcí je konjugace s glutathionem, který je katalyzován **glutathion-S-transferasou**. Tento enzym je považován za velice významnou součást protirakovinných procesů, neboť je schopen vázat reaktivní metabolity, zejména epoxidy, a katalyzovat jejich vazbu s glutathionem ^[13]. Vyskytuje se v mnoha buněčných kompartmentech, a to především v mitochondriích, endoplazmatickém retikulu

i v cytoplasmě a zabezpečuje detoxikaci molekul, které obsahují ve své struktuře elektrofilní centra. V případě navázání nukleofilu, což mohou být nukleové kyseliny nebo proteiny, na tato elektrofilní centra, mohou způsobit vážné poškození buňky nebo genetického materiálu. Vzniklý glutathionový konjugát je z organismu vyloučen v nezměněné podobě žlučí nebo ve formě merkapturových kyselin močí. Vznik merkapturových kyselin zahrnuje postupné odbourávání γ -glutamylového zbytku v ledvinách a glycylového zbytku v játrech pomocí peptidas. Po odštěpení γ -glutamylového a glycylového zbytku dochází k následné acylaci aminoskupiny cysteylového zbytku za vzniku N-acetylcysteinového konjugátu (merkapturové kyseliny), který už může být vyloučen močí. Obdobným způsobem jsou konjugována xenobiotika s cysteinem [22]. Glutathion a cystein jsou považovány za „scavengery“ (vychytávače) cizorodých látek [18].

Ve druhé fázi biotransformace nedochází pouze k detoxikačním reakcím, ale za určitých podmínek může docházet k aktivačním reakcím. Příklad této aktivace můžeme nalézt u konjugátu s aktivním sulfátem vznikajících z N-hydroxylovaných aromatických aminů vlivem jednak sulfotransferas (sulfát musí být pro konjugační reakci nejdříve aktivován na 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS)), tak acetylase katalyzované N-acetyltransferasou. Konjugát acetátu nebo sulfátu s N-hydroxysloučeninou je v kyselém prostředí močových cest nestabilní a dochází k rozpadu za vzniku nitreniového (karbeniového) iontu. Vzniká tedy elektrofil, který je schopen reagovat nukleofilem v podobě molekuly DNA či proteiny [13].



Obrázek 1 Schéma metabolické aktivace a detoxikace karcinogenů pomocí biotransformačních reakcí. Převzato z [20]

1.2 Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO systém)

Mikrosomální monooxygenasový systém, označovaný též jako systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí („*mixed function oxidases*“ systém - MFO systém) je nejvýznamnější soubor enzymů I. fáze biotransformace. Tento systém participuje na celé řadě oxidačních, oxygenačních, popř. redukčních reakcích, přičemž využívá jednu molekulu kyslíku ^[23]. Jedna z typických reakcí katalyzovanou MFO systémem je monooxygenace, která spočívá v aktivaci molekuly kyslíku za pomoci elektronů získaných z NADPH a následné oxygenaci substrátu vzniku hydroxylovaného produktu. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu ^[19,25].

Systém je složen ze tří základních komponent: **biologické membrány**, která má důležitý význam na vzájemném postavení enzymů, jež jsou do ní inkorporovány. Do membrány endoplazmatického retikula je inkorporován **flavoproteinový enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasa**, který funguje jako dělič elektronového páru a **hemthiolátový enzym cytochrom P450** (viz. *kap. 1.2.1.*), jenž má v celém systému funkci terminální oxidasy ^[13]. Vedle těchto tří komponent může MFO systém fakultativně využívat **cytochrom b₅** s příslušnou **NADH:cytochrom b₅ reduktasou** ^[26].

Systém je lokalizován na vnější membráně hrubého i hladkého endoplazmatického retikula v orgánech, které jsou nejvíce vystaveny působením cizorodých látek. Jedná se především o játra, kůže, dýchací systém, ledviny a gastrointestinální trakt. Kromě vnější membrány endoplazmatického retikula se multienzymový komplex oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí nachází na vnitřní membráně mitochondrií, a to především v kůře nadledvinek, kde metabolizují hlavně endogenní substráty, kterými mohou být vitamíny, mastné kyseliny nebo žlučové kyseliny ^[23,24].

1.2.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1) představují velkou rodinu hemthiolátových enzymů, které hrají klíčovou roli v metabolismu cizorodých látek. Cytochromy P450 (označované jako CYP) jsou součástí **systému oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí**, kde plní roli terminální oxidasy ^[27].

Byl nalezen v různých organismech, od archaebakterií přes rostliny až po člověka. Dokonce byl nalezen i u nebuněčných organismů, konkrétně virů ^[10]. Z evolučního hlediska

lze cytochrom P450 považovat za velmi starý hemoprotein, jenž se objevil mnohem dříve než hemoglobin. Je příkladem enzymu, který se vyvíjel cestou divergentní evoluce z předchůdce, který pravděpodobně existoval před více jak 2 miliony let. Z jediného původního genu archaebakterií se v průběhu času vyvinulo obrovské množství rozdílných genů kódujících cytochromy prokaryotních i eukaryotních organismů^[27,28].

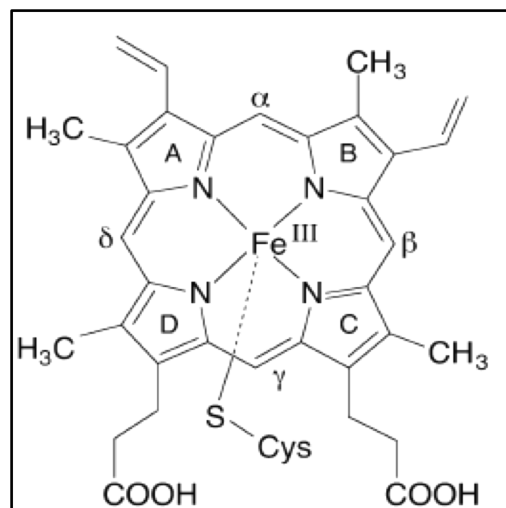
Cytochromy P450 byly poprvé pozorovány na konci 50. let 20. století M. Klingenbergem a D. Garfínkelem jako zvláštní pigmenty vyskytující se v jaterních mikrosomech králíka, které v redukováném stavu v komplexu s oxidem uhelnatým vykazují absorpční maximum při vlnové délce 450 nm^[29,30]. O pár let později, Omura a Sato prokázali hemoproteinový charakter neznámého pigmentu, neboť obsahoval hem jako prosthetickou skupinu. Na základě neobvyklého maxima Soretova pásu a podobnosti povahy vazby hemu cytochromu *b* jej pojmenovali **cytochromem P450**^[31].

Cytochromy P450 jsou v organismech zodpovědné především za reakce I. fáze biotransformace chemických látek, jež vedou k jejich detoxikaci a po reakcích II. fáze biotransformace k jejich eliminaci z buněk a exkreci z organismu. V organismu katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce začleněné do biotransformace léčiv, environmentálních chemikálií (sloučenin dostávající se do životního prostředí především lidskou činností), ale i látek přírodních nebo endogenních^[27]. Vedle detoxikace se mohou podílet i na bioaktivaci, kdy jsou neškodné látky metabolicky transformovány na biologicky aktivnější látky, které mohou být toxické nebo karcinogenní^[32].

1.2.1.1 Struktura, výskyt a funkce cytochromu P450

Cytochromy P450 spadají mezi hemoproteiny typu *b*, které obsahují ve své struktuře kromě apoproteinu i neproteinovou složku ferroporofyrin IX (hem *b*) s centrálním atomem železa, který je koordinován pomocí dusíků tetrapyrrolového jádra a thiolátové síry cysteinu (**obrázek 2** str. 17)^[33,34]. Porfyrinový skelet je v proteinové molekule enzymu vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu, která je přítomna v aktivním centru jako pátý ligand železa. Šestým ligandem může být také atom kyslíku molekuly vody. Vazba mezi centrálním atomem železa a thiolátové síry cysteinu je poměrně silná s velkou elektronovou hustotou na atomu železa^[34,45]. Díky tomuto uspořádání zastává cytochrom P450 výjimečné vlastnosti a s ním spojené spektrální

(charakteristické spektrum redukováného cytochromu v komplexu s oxidem uhelnatým s maximem absorpce při 450 nm) a katalytické (aktivace molekulárního kyslíku) vlastnosti. Na základě výše uvedených vlastností se nejedná se o běžné cytochromy u kterých je hem resp. ion železa vázaný pouze koordinační vazbou na imidazolovém zbytku histidinu, ale o **hemthiolátový protein** ^[34]. V případě poškození Fe-S vazby např. denaturací proteinu, dochází ke konverzi cytochromu P450



Obrázek 2 Struktura hemu b

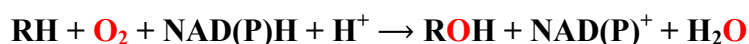
v katalyticky inaktivní formu označovanou jako cytochrom P420 ^[36].

Největší zájem je věnován cytochromům P450 patřící do skupiny enzymů metabolizujících různé látky, léčiva, environmentální polutanty, karcinogenní a toxické látky. Do této skupiny patří hlavně cytochromy P450 genové rodiny 1, 2 a 3, které se účastní metabolismu xenobiotik, a to až ze 70-80 %, a které mají naopak širokou a často překrývající substrátovou specifitu ^[37]. Podílejí se především na odbourávání cizorodých látek z organismu, ale také mohou naopak katalyzovat jejich přeměnu na aktivované karcinogeny, které mají vyšší reaktivitu než původní sloučeniny (prokarcinogeny) ^[38].

Cytochromy P450 se v lidském těle vyskytují mimo svalů a erytrocytů ve všech tkání s nejvyšší koncentrací v játrech, kde probíhá většina biotransformačních reakcí. Dále se nacházejí, v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži mozku a nadledvinkách ^[39]. U člověka bylo nalezeno 57 genů a 58 pseudogenů kódujících cytochromy P450, které jsou na základě sekvenční homologie rozděleny do 18 rodin a 44 podrodin ^[40]. V lidském organismu je většina cizorodých látek metabolizována následujícími jaterními cytochromy P450 1A2, 2A6, 2D6, 2C(8, 9, 18, 19), 2E1 a 3A4. V jiných lidských tkáních (především plíce, ledviny, GIT, kůže), ve kterých se CYP vyskytují ve vyšších koncentracích, se na biotransformační reakce xenobiotik nejvíce podílejí cytochromy P450 1A1, 2B6, 2E1 a 3A4. Množství CYP v jednotlivých tkáních je ovlivněno řadou faktorů jako jsou např. vnější podmínky (environmentální polutanty), věk, výživa, užívání léčiv a konzumace alkoholických nápojů. Dále mezi tyto faktory patří genetický polymorfismus a vliv induktorů a inhibitorů ^[27].

1.2.1.2 Reakční mechanismus cytochromu P450

Nejtypičtější reakcí katalyzovanou cytochromem P450 je monooxygenasová reakce, při které dochází k aktivaci molekulárního kyslíku a následné inkorporaci jednoho atomu kyslíku do molekuly hydrofobního substrátu při současné redukci druhého atomu kyslíku na vodu. Průběh této monooxygenasové reakce lze vyjádřit obecně následující sumární rovnicí, kde RH představuje substrát a ROH hydroxylovaný produkt ^[7].



Cytochrom P450 v MFO systému hraje roli jako terminální monooxygenasa, která vykonává dvě elementární funkce, a to funkci oxidasovou a monooxygenasovou. Aktivace molekuly kyslíku cytochromy P450 představuje oxidasovou aktivitu, zatímco zabudovávání jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu představuje aktivitu oxygenasovou. Aktivace kyslíku je zprostředkována dvěma elektrony, které jsou dodávány postupně (v tzv. první a druhé redukci CYP) z NADPH přenesené NADPH:cytochrom P450 reduktasou, v případě donoru druhé elektronu se může stát i NADH přenesený NADH:cytochrom b₅ reduktasou. Cytochrom P450 může pro oxidační reakce využívat kromě molekuly kyslíku také peroxidy a peroxykyseliny, které se také stávají donorem atomu kyslíku ^[9].

Reakční cyklus cytochromů P450 probíhá uspořádaným mechanismem a je alespoň složen z osmi kroků ^[9,41]. Schéma reakčního cyklu je znázorněno na **obrázku 3** (str. 20).

1. **Klidový stav CYP.** V klidovém stavu na začátku cyklu se ion železa hemu nachází ve „ferri“ formě (v oxidačním čísle III) a je hexakoordinován, tedy v nízkospinovém stavu. Šestá valence je obsazena molekulou vody nebo interním aminokyselinovým ligandem.
2. **Vazba substrátu.** Navázání molekuly substrátu do aktivního proteinu je vytěsňen šestý ligand iontu železa, čímž se změní jeho koordinační stav a stává se pentakoordinovaným (vysokospinový stav). Současně také dochází ke konformační změně v molekule proteinu, které se projevují spektrální vlastností cytochromu P450.
3. **První redukce CYP.** Nárůst reakčního potenciálu a konformační změna způsobená navázáním substrátu umožňuje jedoelektronovou redukci CYP prostřednictvím NADH:cytochrom P450 reduktasy. Ion železa hemu v oxidačním čísle III („ferri“ forma) se přitom redukuje na oxidační číslo II („ferro“ forma), přičemž jeho

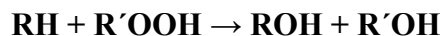
koordinační stav však zůstává nezměněn, tedy ve vysokospinovém stavu. V této „ferro“ formě je následně enzym schopný vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy např. oxid uhelnatý (**4A**), který však reakci inhibuje.

4. **Vazba molekuly kyslíku.** Navázáním molekulárního kyslíku vzniká ternární komplex cytochrom P450-O-O substrát, který následně přechází do druhého mezomerního stavu na tzv. ferri-superoxidový komplex. V tomto komplexu je ion železa opět hexakoorinovaný a nachází se v nízkospinové formě.
5. **Druhá redukce CYP.** Nepříliš stabilní komplex je podruhé redukován elektronem přeneseným z již výše zmíněné reductasy a dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion. Druhé redukce se může účastnit i jiný systém, kdy jsou elektrony z NADH přenášeny NADH:cytochrom b₅ reduktasou prostřednictvím cytochromu b₅. Po druhé redukci vzniká ferro-superoxidový komplex. Jde o reakci, která je finálním stupněm tzv. aktivační fáze reakčního cyklu.
6. **Štěpení vazby O-O v molekule kyslíku.** Komplex cytochromu P450 s molekulou kyslíku je po redukci druhým elektronem již plně aktivní formou. Poté dochází k heterocyklickému štěpení vazby O-O, kdy jeden atom kyslíku je redukován na oxidový anion (O^{2-}) a po přijetí dvou protonů se uvolní jako voda. Druhý atom kyslíku zůstává navázán na železe hemu za vzniku ferrioxenového komplexu, který je stabilizován posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Takto vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylovaného radikálu vázaného na železe hemu.
7. **Rekombinace radikálů.** Ve finálním kroku dochází k rekombinaci obou výše zmíněných radikálů za vzniku hydroxyderivátu substrátu vázaného na ion železa hemu. Nestálý hydroxylovaný produkt z aktivního centra proteinu disociuje a dochází k obnovení nativní formy CYP (**1**).

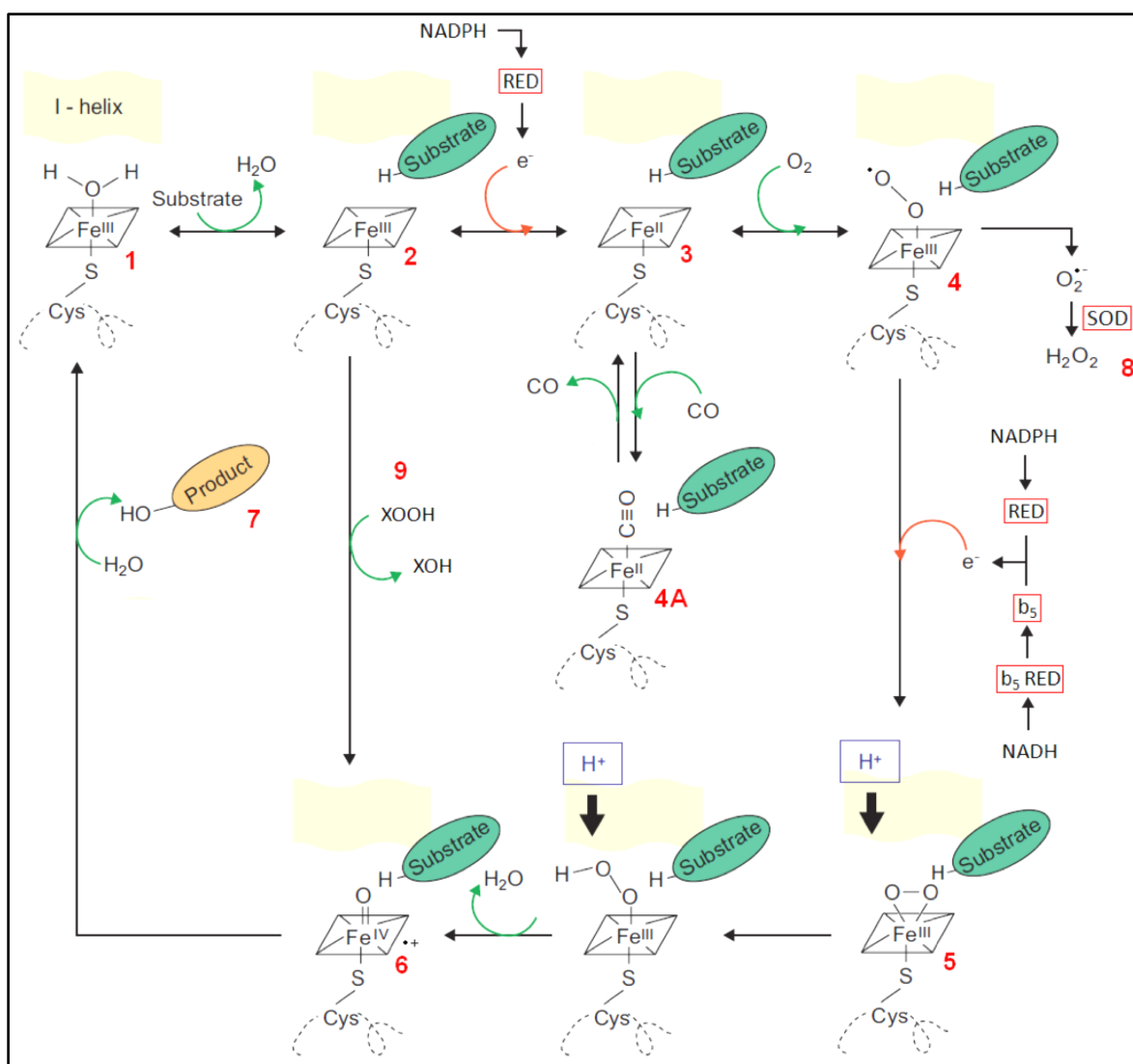
Není-li druhý elektron doručen dostatečně rychle, tak se ternární ferri-superoxidový komplex (**4**) rozpadá a uvolňuje se superoxidový anionradikál. Tento děj může vyvolat substrát, který se slabě váže do aktivního místa enzymu, čímž destabilizuje ferri-superoxidový komplex. Vzniklý superoxidový anionradikál je následně superoxiddismutasou (SOD) přeměněn na peroxid vodíku (**8**)^[7,35].

Jak již bylo výše zmíněno, cytochrom P450 má vedle oxidasové a oxygenasové funkce i funkci peroxidasovou. Pro oxygenaci mohou cytochromy P450 využívat kromě

samotné molekulárního kyslíku i peroxidy, peroxikyseliny nebo hydroperoxydy (9). V případě, že zdrojem kyslíku i elektronů je peroxid, tak tato schopnost se označuje jako peroxidasová aktivita CYP. Sumární rovnici peroxidasové aktivity lze vyjádřit:



kde RH představuje substrát, R'OOH-hydroperoxid, ROH-hydroxylovaný produkt reakce a R'OH představuje alkohol vzniklý redukcí hydroperoxidu. Tyto reakce probíhají na rozdíl od reakce v přítomnosti NADPH a molekulárního kyslíku neuspořádaným mechanismem, takže vazba peroxidu není závislá na vazbě substrátu [9,42].



Obrázek 3 Shéma reakčního mechanismu monooxygenásové reakce cytochromu P450 s naznačenou peroxidasovou aktivitou a tvorbou komplexu s oxidem uhelnatým. RED-NADPH:cytochrom P450 reduktasa, b_5 -cytochrom b_5 , b_5 RED-NADH:cytochrom b_5 reduktasa, SOD-superoxiddismutasa. Převzato a upraveno podle [41]

1.2.1.3 Regulace hladiny cytochromu P450 indukci enzymu

Cytochromy P450 jsou z hlediska indukce enzymy **konstitutivní** nebo **inducibilní**. O konstitutivních isoformách hovoříme, pokud je jejich obsah v určité tkáni přibližně konstantní. Zatímco u inducibilních isoform je to odlišné, ty jsou v tkáních či orgánech přítomné v nepatrném množství, avšak jejich koncentrace se může za určitých podmínek výrazně zvýšit. K silně inducibilním enzymům patří většina cytochromů P450 ^[27].

Variabilita obsahu jednotlivých CYP v jednotlivých tkání je dána jejich možností indukce. Ta je definována jako nárůst exprese katalyticky aktivních forem enzymů, při které dochází ke zvýšení transkripce na základě stimulace chemickým signálem ^[43].

Indukci enzymu můžeme rozdělit na přímou a nepřímou. Na úrovni transkripce se jedná o přímou indukci CYP, která spočívá v navázání ligandu na specifický extracelulární (cytosolární, jaderný) receptor, který zprostředkovává děje vedoucí k transkripci příslušného genu. Mezi významné receptory indukující cytochromy P450 především genových rodin 1-4, tedy těch, které participují na biotransformaci cizorodých látek, patří: ^[43,44,45,46].

❖ AhR (Aryl hydrocarbon receptor)

AhR je cytosolární receptor stimulující transkripci genů a také participující na indukci CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1. Mezi induktory interagující s AhR patří polycyklické aromatické uhlovodíky, β -nitroflavon, Sudan I, benzo[a]pyren aj.

❖ CAR (Constitutive androstane receptor)

CAR je také jaderný receptor zvyšující expresi CYP2A6, 2B6, 2C(8, 9, 19) a CYP2D6, tedy cytochromů P450 genové rodiny 2. Mezi xenobiotika této rodiny CYP patří např. fenobarbital (PB).

❖ PXR (Pregnane X receptor)

PXR je jaderný receptor účastnící se indukce enzymu CYP3A4, CYP3A5 a CYP2C9. Mezi induktory aktivující tento receptor patří pregnenolon-16 α -karbonitril (PCN) a dexamethason.

❖ PPAR (Peroxisome proliferator receptor)

PPAR je dalším jaderným receptorem, jehož prostřednictvím se zprostředkovává indukce CYP4A. Mezi induktory CYP4A patří např. fibráty.

Tři výše zmíněné jaderné receptory obsahují vazebnou doménu pro DNA. V případě navázání ligandu na receptor, vytváří s dalším jaderným receptorem RXR (retinoid X receptor) heterodimer, který je schopen se vázat na různá místa v DNA (rozpoznávací

element genu), které kódují CYP^[46]. Princip nepřímé indukce spočívá ve stabilizaci vzniklé mRNA nebo zásahem do translačních či potranslačních procesů. Příkladem regulace exprese genů na posttranskripční úrovni je indukce CYP2E1 látkami o malé molekulové hmotnosti jako je ethanol nebo aceton vzniklý hladověním^[18,27].

1.2.1.4 Regulace hladiny cytochromu P450 inhibicí enzymu

Inhibitory jsou sloučeniny, které snižují katalytickou aktivitu enzymu v dané tkáni. Dělí se podle způsobu vazby na enzym, a to na kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní. Běžně dochází k smíšenému typu inhibice. Míra inhibice závisí na koncentraci daného inhibitoru a čase expozice. K samotné inhibici enzymu může docházet pomocí vzniku přechodného komplexu nebo silné kovalentní vazby^[46].

K inhibici enzymu dochází v důsledku vazby inhibitoru na stejný enzym. Dochází tak ke kompetitivní inhibici nebo k navázání inhibitoru na jiné místo enzymu, což způsobí jeho konformační změnu a zabránění vazby substrátu do aktivního místa (nekompetitivní inhibice). Tento proces se projeví následným zpomalením metabolismu léčiva a jeho kumulací v organismu^[47].

V katalytickém cyklu CYP může docházet k zásahu inhibitoru ve třech krocích. Jedná se o první reakci, kde dochází k vazbě substrátu na enzym. Další místo zásahu je u třetí reakce, kdy dochází k vazbě molekulárního kyslíku, po které následuje první přenos elektronu. A jako poslední místo je krok, ve kterém je substrát oxidován. Inhibitory cytochromů P450 se dělí do 3 skupin: ^[44]

- ❖ Inhibitory, které se vážou reverzibilně. Probíhá kompetice o aktivní místo enzymu mezi substrátem a inhibitorem. Vazba inhibitoru je slabá a lze ji rozrušit.
- ❖ Inhibitory, které tvoří „kvazi“-ireverzibilní komplex s centrálním atomem železa. Tyto inhibitory jsou metabolizovány cytochromy P450 na aktivní intermediát, který se pevně váže na hemové železo.
- ❖ Inhibitory, které se vážou kovalentně (ireverzibilně) na hemovou, proteinovou část nebo urychlují degradaci a oxidační rozpad hemové prosthetické skupiny.

1.2.1.5 Cytochrom P450 2E1

Významnou podrodinou zapojenou do metabolismu cizorodých látek je podrodina cytochromu P450 2E, která u lidí zahrnuje pouze jednu izoformu, a to CYP2E^[48]. V lidském těle se vyskytuje ve vyšších koncentracích především v játrech, ale byl nalezen také v jiných

orgánech jako jsou ledviny plíce, srdce, mozek a kostní dřeň ^[49]. Typickými substráty CYP2E1 jsou lipofilní látky s nízkou molekulovou hmotností. Společně s enzymem alkoholdehydrogenasou (ADH) participuje na metabolismu ethanolu. Nicméně je však známo, že v tomto procesu je hlavním enzymem ADH a CYP2E1 má spíš doplňující roli, která se projevuje v krajních případech spojených s přítomností vysoké koncentrace ethanolu v organismu, případně při snížení koncentrace ADH. Dalšími jeho substráty jsou halogenované uhlovodíky a organická rozpouštědla (aceton, acetonitril, benzen, chloroform) a dále isoniazid, disulfiram a nitrosoaminy. Podílí se také na metabolismu inhalačních anestetik jako jsou halotan, enfluran, izofluran a sevofluran a na metabolismu mastných kyselin s uhlovodíkovým řetězcem obsahujícím 9 až 20 uhlíkových atomů. V případě, že mastná kyselina obsahuje více než 20 uhlíkových atomů, tak se enzym metabolismu této mastné kyseliny neúčastní, jelikož není schopen přizpůsobit své aktivní místo substrátu takové velikosti. Jelikož většina substrátů CYP2E1 jsou molekuly o nízké molekulové hmotnosti, tak jeho aktivní místo v porovnání s ostatními CYP je velmi malé ^[48,50,51].

Cytochrom P450 2E1 je jeden z hlavních CYP, který se podílí na metabolismu poměrně velkého počtu prokarcinogenů či toxinů s nízkou molekulovou hmotností. Příkladem je aktivace N-nitrosaminů, které jsou obsaženy v tabákovém kouři, a které následně působí genotoxicky ^[50].

Z hlediska indukce se jedná o konstitutivní enzym vyskytující se v jaterní tkáni, který je však také indukovatelný řadou látek, které jsou většinou i substráty tohoto enzymu. Za nejznámější induktory CYP2E1 lze považovat ethanol a aceton, fyziologicky důležitá je indukce tohoto enzymu vyvolaná hladověním (endogenní tvorba acetonu) ^[27]. Zvýšené množství CYP2E1 může být způsobena zvýšením transkripce, stabilizací mRNA nebo přímo stabilizací proteinu. Na rozdíl od ostatních CYP, indukce této formy není zprostředkována vazbou ligandů na jaderné receptory, ale podílí se na ni faktory stabilizace uvedené výše ^[48,49].

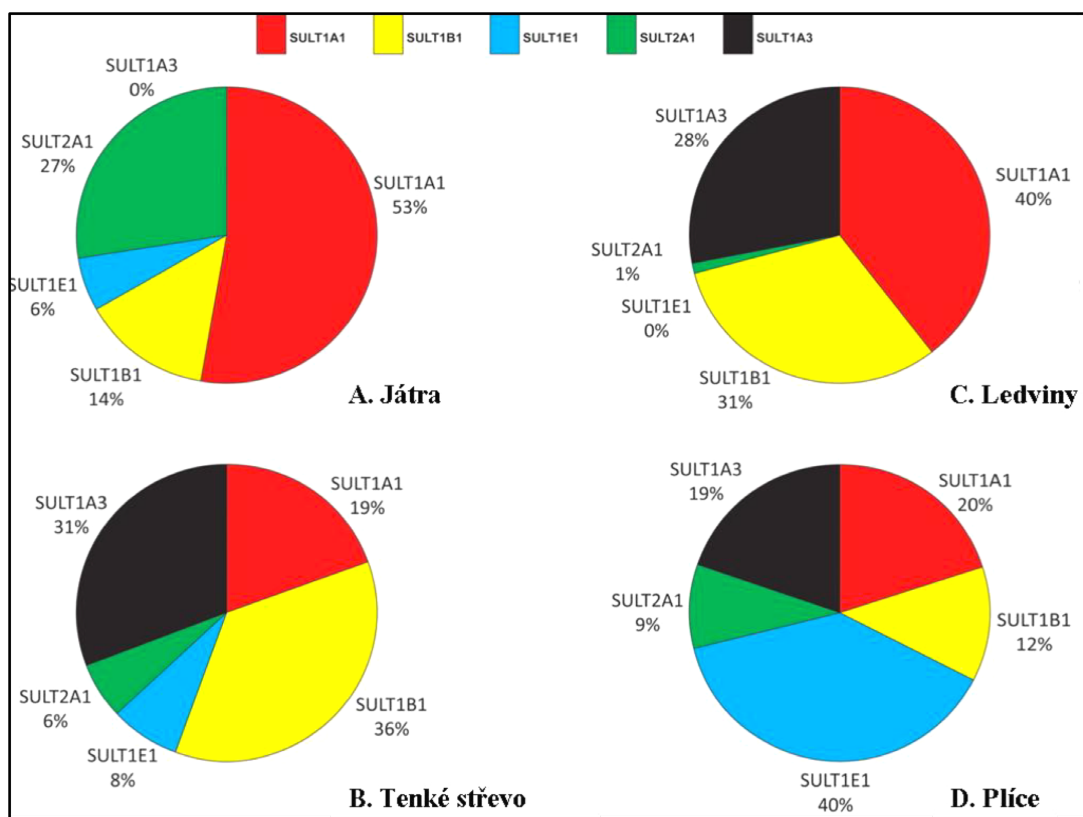
Cytochrom P450 2E1 je také studován v souvislosti s hepatotoxicitou. Kromě své schopnosti aktivovat substráty na reaktivnější intermediáty, jak je tomu v případě již výše zmíněných N-nitrosaminů, může také vyvolat oxidační stres. Vedlejším produktem reakce katalyzované CYP2E1 jsou reaktivní formy kyslíku (ROS), které následně reagují s DNA, lipidy a proteiny. Tento proces bývá uváděn jako jedna z příčin steatózy jater při chronickém alkoholismu ^[52].

1.3 Cytosolární sulfotransferasy

Sulfatace, správněji sulfonace nebo sulfurylace, je důležitá konjugiční dráha spadající do druhé fáze biotransformace, která je zodpovědná za detoxikaci a následnou eliminaci endogenních a exogenních látek. Tyto reakce jsou katalyzovány rodinou enzymů nazývajících se **cytosolární sulfotransferasy** (označované SULT), které specificky katalyzují přenos sulfurylové skupiny (SO_3^-) z koenzymu 3'-fosfoadenosinu-5-fosfosulfátu (PAPS) na reaktivní funkční skupiny produktů derivatizační fáze nebo na substráty, které již obsahují amidové (NH_2^-) nebo hydroxylové (OH^-) skupiny. Substráty mohou být exogenní (xenobiotika, léčiva) i endogenní (vitamíny, hormony, steroidní látky) molekuly, které jsou pomocí *O*-sulfatace nebo *N*-sulfatace přeměněny na biologicky nereaktivní metabolity, které jsou posléze eliminovány z těla převážně v moči nebo žluči. Nicméně, některá xenobiotika jsou prostřednictvím sulfatace aktivována na metabolity s nežádoucí biologickou aktivitou. Tato aktivace probíhá zpravidla u xenobiotik vyskytujících se v ovzduší nebo potravě a zároveň přispívá ke vzniku vysoce reaktivních intermediátů, které mohou působit jako chemické karcinogeny a mutageny^[53,54].

V savčím organismu můžeme rozlišit dvě skupiny sulfotransferas. První skupina participuje na metabolismu endogenních látek (steroidy) a je lokalizována v buňkách Golgiho aparátu. Zatímco druhá skupina sulfotransferas, která je lokalizovaná v cytosolu, katalyzuje biotransformační reakce xenobiotik a nízkomolekulárních endogenních látek (neurotransmitery, hormony)^[55].

Cytosolární sulfotransferasy se vyznačují širokou tkáňovou distribucí, která se liší mezi svými druhy. Jsou exprimovány zejména v játrech, tenkém střevě, nadledvinách, plicích, mozku a kůži^[54]. Ze 13 známých lidských sulfotransferas je většina z nich do různé míry popsána. Mezi sulfotransferasy, které se podílejí u člověka na metabolismu léčiv patří SULT1A1, SULT1A3, SULT1B1, SULT1E1 a SULT2A1. Na **obrázku 4** (str. 25) jsou uvedeny grafy znázorňující zastoupení jednotlivých sulfotransferas ve vybraných tkáních lidského těla. Z grafu je patrné, že SULT1A1 je hlavním enzymem exprimovaným v játrech (tvoří 50 % z celkového sulfotransferasového proteinu) následovaný SULT2A1, SULT1B1 a SULT1E1. SULT1A1 je také majoritně exprimovaná v ledvinách. Naopak v tenkém střevě je exprese tohoto enzymu snížena oproti SULT1B1, SULT1A3, které jsou ve střevní tkáni exprimovány ve zvýšené míře^[56].



Obrázek 4 Lidské sulfotransferasy podílející se v metabolismu xenobiotik a jejich poměrné zastoupení ve vybraných tkáních lidského těla. Převzato z ^[56]

Z hlediska struktury jsou cytosolární sulfotransferasy dimerní, rozpustné globulární proteiny s charakteristickými čtyřmi nebo pěti β -strukturami obklopenými α -helixy. Katalytické místo společně s místem vázající koenzym PAPS je tvořeno β -strukturami. Vazebné místo koenzymu PAPS je vysoce konzervované, v případě mutace pouhých tří aminokyselinových zbytků dochází ke kompletní inaktivaci enzymu. Naopak vazebná místa zodpovědná za vazbu substrátu jsou velmi variabilní, což se projevuje na široké substrátové specifitě jednotlivých isoform schopných katalyzovat řadu sloučenin ^[57].

Vzhledem k tomu, že sulfotransferasy se vyznačují širokou substrátovou specifitou, představují riziko tvorby toxických metabolitů. Sulfatace je považována za detoxikační reakci, při které vznikají méně nebo netoxické metabolity. Nicméně, některé prokarcinogeny a promutageny mohou být metabolicky aktivovány za vzniku nestabilních sulfátových intermediátů, které se spontánně rozpadají na sloučeniny obsahující elektrofilní nitréniové ionty. Tyto vysoce reaktivní, aktivované sloučeniny reagují s nukleofilními molekulami včetně proteinů a DNA s nimiž vytvářejí adukty, které vedou k mutacím ^[58].

Inducibilita, jako významná vlastnost enzymu, hraje důležitou roli v biotransformačních procesech. Induktory jsou většinou léčiva, potravinové doplňky a doplňky stravy. V experimentech *in vitro* a *in vivo* bylo zjištěno, že některé flavonoidy jsou modulátory sulfotransferas. Známými inhibitory SULT jsou například kaempferol, chrysin, apigenin nebo genistein ^[59]. Indukce enzymů SULT přírodními sloučeninami, např. biochininem A byla také prokázána ve studiích *in vivo* ^[60].

1.3.1 Sulfotransferasa 1A1

Sulfotransferasa 1A1 je enzym, který je předmětem zájmu této práce. Enzym SULT1A1 je nejstudovanějším členem superrodiny sulfotransferas a zároveň nejdetailněji charakterizovanou sulfotransferasou vyznačující se širokou substrátovou specifiitou a širokou tkáňovou distribucí. Účastní se biotransformačních reakcí xenobiotik včetně bioaktivace prokarcinogenů. SULT1A1 je konjugací enzym, který je zodpovědný za sulfonaci malých endogenních sloučenin jako jsou hormony, tak exogenních sloučenin (xenobiotika včetně léčiv a karcinogenů). Původně byl nazýván jako fenolická nebo termostabilní sulfotransferasa (P-PST nebo TS-PST) ^[53,61].

SULT1A1 společně s SULT1B1 jsou hlavními enzymy podílejícími se na metabolismu xenobiotik u lidí a společně zodpovídají za téměř 70 % sulfotransferasové aktivity v játrech ^[56]. Mezi hlavní substráty SULT1A1 patří steroidní endogenní sloučeniny např. estradiol, thyroïdní hormony např. dopamin, aromatické xenobiotika např. *p*-nitrofenol, *p*-naftol a léčiva jako jsou acetaminofen, tamoxifen a minoxidil. SULT1A1 je považována za enzym zapojený převážně do metabolismu xenobiotik. Je však také známo, že tento enzym aktivuje různé prokarcinogeny jako jsou hydroxymethylpolycyklické aromatické uhlovodíky, N-hydroxyderiváty arylaminů a heterocyklické aminy na vysoce reaktivní intermediáty schopné se vázat na DNA, což má za následek mutagenní a karcinogenní účinky na buňku ^[61,62].

1.4 Flavonoidní látky

Flavonoidy neboli flavonoidní sloučeniny jsou součástí rodiny přírodně vyskytujících se polyfenolických sloučenin. Představují jednu z nejrozšířenějších tříd látek vyskytujících se v zelenině, ovoci a nápojích získaných z rostlin, stejně jako v mnoha potravinových doplňcích nebo léčivých bylinách ^[63]. V ovoci se vyskytují v citrusech, meruňkách, šípcech,

grapefruitech, jablkách, červeném rybízu, višních a borůvkách. V zelenině se vyskytují zejména v cibuli, zelených paprikách, brokolici, rajčatech a špenátu. Vyskytují se také v sóje a bylinách (např. *Gingo biloba*). Dále jsou obsaženy v nápojích jako je káva, čaj, červené víno, kakao a pivo^[64,65].

Slovo flavonoid je odvozeno z latinského slova *flavus*, které znamená žlutý. Flavonoidy se běžně vyskytují jako deriváty esterů, etherů nebo glykosidů a v současné době jich bylo identifikováno více než 8000 a stále se objevují další^[66]. Významné jsou hlavně pro své účinky, které jsou antioxidační, antibakteriální, protizánětlivé a protialergické. Nicméně ne všechny flavonoidy působí na organismus pozitivně. Některé z nich vykazují i mutagenní účinky nebo mají schopnost ovlivňovat různé typy enzymů a buněčných receptorů, popřípadě zasahují do biochemických drah metabolismu endogenních sloučenin^[64].

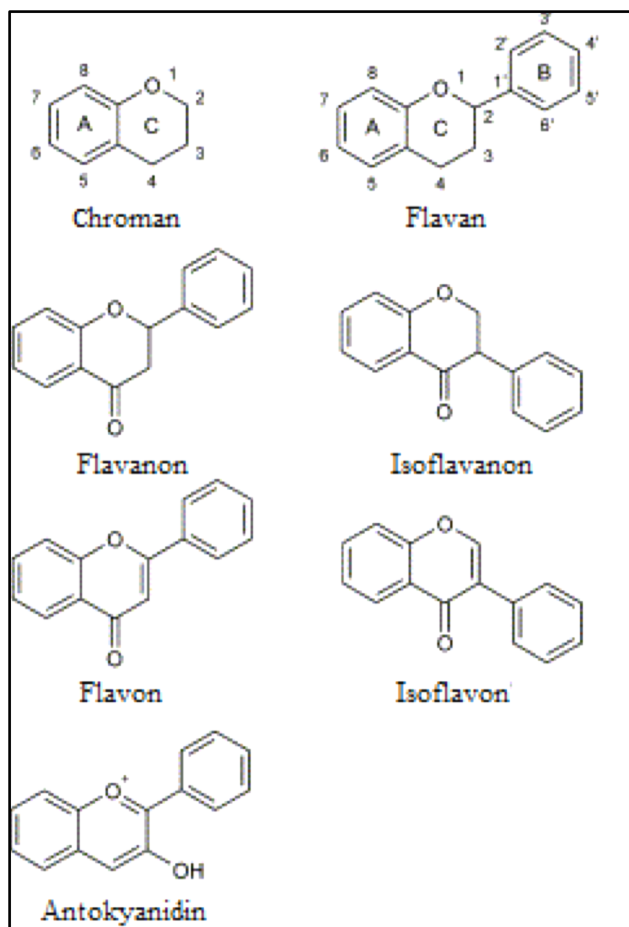
Flavonoidy se řadí mezi sekundární metabolity rostlin, které plní celou řadu funkcí. Například antokyanidiny, které jsou nejčastěji barviva květů, tak také zasahují do dějů spojených s reprodukcí rostlin. Jiné flavonoidy jsou důležité pro regulaci rostlinného růstu a rozvoje a také se podílejí na ochraně rostlin před nemocemi, predátory a UV zářením. Ochraňují buňky před toxickým působením škodlivých látek z vnějšího a vnitřního prostředí, které se tvoří v rostlinném organismu^[67,68,69].

1.4.1 Struktura flavonoidních látek

Základní strukturou flavonoidů je tzv. flavonový skelet ($C_6-C_3-C_6$), tedy 2-fenyl-1-4-benzo[a]pyren, který je znázorněn na **obrázku 5** (str. 28), sestávajícího z 15 uhlíků ve dvou benzenových jader (kruh A a kruh B) a pyranového kruhu C, napojeného na kruh A. Za jejich typické vlastnosti je zodpovědný právě pyranový kruh obsahující kyslíkový atom^[63].

Na základě modifikace flavonového skeletu se flavonoidy dělí do několika podskupin (**obrázek 5** str. 28)^[64]: flavany, flavonoly, flavanony, isoflavanony, flavony, isoflavony, antokyanidiny. Rozdělení do těchto tříd je závislé na substituci, oxidaci nebo (ne)přítomnosti dvojné vazby mezi druhým a třetím uhlíkem pyranového kruhu^[66]. V případě, že se substituovaný fenyl nachází v pozici C2 či C3 na pyranovém kruhu, tak mluvíme o flavanech. Je-li v pozici C4 oxo-skupina a současně substituce fenylem na C2, popřípadě C3, jedná se o flavanony a isoflavanony. Přítomnost dvojné vazby mezi C2 a C3 na pyranovém kruhu spolu se substitucí na C2, je typická pro flavony a na C3 pro isoflavony. Přítomnost další

dvojn  vazby na pyranov m kruhu namísto oxo-skupiny,  in  tyto sloučeniny barevn , kter  nazýváme antokyanidiny. Jako flavonoidy jsou také klasifikovány chalkony, tedy bicycklick  sloučeniny, kter  obsahují pouze 2 kruhy a otevřen  C kruh ^[64]



Obrázek 5 Struktury jednotlivých skeletů flavonoidů. Převzato a upraveno z ^[64]

Ve flavonoidech obvykle dochází k hydroxylaci na pozici 3, 5, 7, 3', 4' nebo 5', kdy posléze jsou hydroxylovan  skupiny methylovány, acetylovány či sulfatov ny. V rostlinách se flavonoidy nejčastěji vyskytují v podobě glykosylovaných nebo esterifikovaných konjugátů. O-glykosidy mají cukernou složku navázanou přes hydroxylovou skupinu aglykonu, nejčastěji v poloze 3 nebo 7, zatímco C-glykosidy mají cukernou složku navázanou přimo na uhlík v poloze 6 nebo 8. Bylo identifikováno 80 různých cukrů, kter  se v z  na flavonoidy ^[63]. Nej ast j i cukernou složkou bývá rhamnosa, glukosa, galaktosa a arabinosa. Voln  aglykony se nevyskytují přil i často ^[70].

1.4.2 Metabolismus flavonoidních látek

Metabolismus flavonoidů probíhající u člověka stejně jako u experimentálních zvířat zahrnující enzymy I. a II. fáze biotransformace není doposud zcela objasněn^[64]. V těle savců existují dvě hlavní místa, kde probíhá metabolismus flavonoidů a to konkrétně ve střevě a játrech. Střevní mikroflóra konvertuje flavonoidy na „volné“ flavonoidy (aglykony) nebo fenolické kyseliny. Zda je účinnější celá molekula nebo aglykonová forma flavonoidu, závisí na konkrétní sloučenině a jeho biologické aktivitě^[71].

Absorpce, biotransformace a eliminace flavonoidů je komplexní proces zahrnující strukturní modifikace požitého flavonoidu v tkáňových a buněčných kompartmentech. Flavonoidy jsou převážně absorbovány v tlustém střevě, přičemž malé množství se absorbuje již žaludeční sliznicí. Většina flavonoidů se vyskytují v konjugované nebo glykosidové (β -forma) formě, která výrazně ovlivňuje mechanismus absorpce. Metabolismus flavonoidů vyskytující se v β -glykosidové formě začíná ve střevě, kde dochází k hydrolýze cukernaté části za vzniku aglykonů. Flavonoidní aglykony vzniklé hydrolýzou sacharidové části jsou více lipofilní, a proto jsou snadno absorbovány ve střevě pasivní difuzí^[64,72,73].

Druhým důležitým místem transformace flavonoidů je jaterní tkáň, která je bohatá na enzymy I. a II. fáze biotransformace. Ty postupně podléhají hydroxylaci a/nebo O-demethylaci cytochromy P450 a následně jsou podrobeny konjugačním reakcím (glukuronidace, sulfatace, O-methylace). Tyto konjugace jsou v podstatě detoxikační reakce II. fáze biotransformace, které vedou ke zvýšení molekulové hmotnosti a zlepšení rozpustnosti, což zvyšuje vylučování sloučeniny ve žluči nebo moči^[64,73].

1.4.3 Biologické účinky flavonoidních látek

Ve vztahu k člověku jsou flavonoidy všeobecně chápány jako prospěšné látky. Vykazují širokou paletu biologických aktivit, neboť jsou důležitou součástí antioxidačního systému, zabraňující peroxidaci lipidů a vychytávání volných kyslíkových radikálů. Dále mohou chelatovat a inaktivovat některé peroxidační bivalentní kovalentní ionty, jakými jsou železo nebo měď. Na základě těchto vlastností jsou považovány za **chemopreventivní látky**^[74].

Flavonoidní sloučeniny vykazují mnoho pozitivních účinků na člověka, přičemž za nejvýznamnější je podkládán **antioxidační účinek**. Ve všech aerobních buňkách se

přirozeně vyskytují reaktivní formy kyslíku (ROS), které jsou odvozené z metabolismu molekulárního kyslíku. Mezi reaktivní formy kyslíku patří superoxidový kyslíkový radikál (O_2^-), singletový kyslík (1O_2), peroxid vodíku (H_2O_2) nebo také vysoce reaktivní hydroxylový radikál ($\cdot OH$), které jsou vedlejšími produkty reakcí probíhající především v mitochondriích, peroxisomech a endoplazmatickém retikulu. Koncentrace ROS je regulována antioxidačními enzymy, mezi které patří superoxiddismutasa (SOD), která katalyzuje konverzi superoxidového radikálu na méně toxický peroxid vodíku a kyslík a glutathionperoxidasa, která katalyzuje štěpení peroxidu vodíku a současně oxidaci cysteinu obsahující glutathion. Dalším antioxidačním enzymem je katalasa, která katalyzuje štěpení peroxidu vodíku na vodu a kyslík [75].

ROS nejsou vždy pokládány za metabolicky škodlivé produkty, jelikož za fyziologické koncentrace a přísné regulace fungují jako intracelulární signální molekuly. Nicméně zvýšená koncentrace ROS může být způsobena působením vnějších vlivů, např. kouření cigaret, konzumace alkoholických nápojů a léčiv, působením UV zářením aj. Zvýšená hladina ROS má za následek oxidativní poškození buněčné DNA, které mohou vést i k aktivaci onkogenů a k vícestupňové karcinogenezi. Změny v DNA, jako je modifikace dusíkaté báze, přeskupení DNA sekvence, duplikace genů a aktivace onkogenů, se mohou podílet na iniciaci různých nádorových onemocnění [76,77].

Zvýšený příjem flavonoidů, respektive jakýchkoliv antioxidačních látek snižuje koncentrační hladinu ROS vzniklých oxidačním stresem a tím omezuje vzniku poškozených biomakromolekul včetně DNA. Antioxidační účinek flavonoidů spočívá v přímém vychytávání ROS. Dále mohou snižovat tvorbu ROS inhibicí enzymů, které je produkují nebo chelatací stopových prvků, které se podílejí na tvorbě reaktivních radikálů. Jedná se především o enzymy mikrosomální monooxygenasy, glutathion-S-transferasu, mitochondriální sukcinyloxydazu, NADH oxidasu. Jejich antioxidační aktivita závisí na počtu a pozici hydroxylových skupin. Aglykonní flavonoidy s nenasycenou vazbou mezi druhým a třetím uhlíkem a karbonylovou skupinou na čtvrtém uhlíku jsou považovány za nejlepší antioxidanty [70]. Ve studii bylo prokázáno, že aglykony jako je kvercetin, luteolin, myricetin a kaempferol vykazují vyšší antioxidační aktivitu než jejich konjugované formy jako kvercetin-3-glukosid, kvercitrin a rutin [78].

Kromě antioxidačních účinků jsou flavonoidům na základě studií v podmínkách *in vitro* a *in vivo* připisovány protibakteriální, protizánětlivé, protialergenní, protimutagenní, protikarcinogenní a protivirové vlastnosti [79]. Ukazuje se, že přírodní flavonoidy pomáhají

při léčbě a prevenci mnoha chorob majících původ v oxidačním poškození biologických struktur. Chrání vnitřek cév, neboť způsobují flexibilitu a permeabilitu krevních kapilár. Působí jako ochrana před zvýšenou lámavostí krevních vlásečnic, a pozitivně tak ovlivňují mikrocirkulaci krve v poškozených tkáních ^[80].

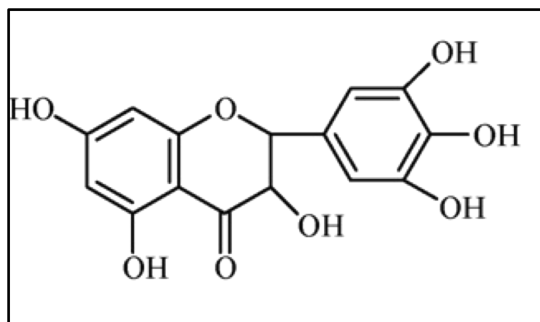
Přestože flavonoidy vykazují celou řadu prospěšných aktivit, je nutno tyto sloučeniny konzumovat (obvykle ve formě potravinových doplňků) velice uvážlivě, neboť mohou mít i negativní dopad na lidský organismus. Přestože neexistují žádné skutečné důkazy o nežádoucích účincích těchto sloučenin, tak některé z nich mohou působit škodlivě ^[64]. Bylo zjištěno, že některé flavonoidy vykazují cytotoxické, mutagenní a prooxidační účinky ^[64,81]. Vzhledem k tomu, že jsou metabolizovány v rámci biotransformačních cest, musí být brán zřetel i na jejich možné nežádoucí interakce s enzymy první a druhé fáze biotransformace, které jsou mimo jiné zodpovědné za metabolickou aktivaci prokarcinogenů na reaktivní metabolity vyvolávající karcinogenezi ^[82].

Stručně řečeno, toxicita flavonoidů závisí na dávce. Velmi vysoké dávky ($\geq 1\text{ g/kg}$) pravděpodobně budou mít toxické účinky. Vzhledem k tomu, že doporučená dávka flavonoidů je 14 mg/kg , tak se předpokládá, že u člověka žádné vedlejší účinky nevzniknou. Proto je třeba provést rozsáhlé studie na zvířatech a dlouhodobé klinické studie zabývající se bezpečným příjmem flavonoidů lidskou populací ^[83].

1.4.4 Dihydromyricetin

Dihydromyricetin (dHMR) jehož struktura je znázorněna na **obrázku 6** je bioaktivní flavonoid s oficiálním názvem ((2R,3R)3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5 trihydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-on). Nejčastěji bývá izolován ze dvou rostlin, jimiž jsou *Hovenia Dulcis* (Dužistopka sladká) a *Ampelopsis grossedentata* podle níž se dihydromyricetin také nazývá jako ampelopsin ^[84,85].

Hovenia Dulcis, přezdívaná jako Japonský hrozinkový strom, je strom z čeledi řešátkovitých, který je původem z východní



Obrázek 6 Chemická struktura dihydromyricetinu

Asie. Přirozeně se vyskytuje v Japonsku, Koreji Číně a dokonce Himalájích. Roste ve slunečných polohách na vlhkých písčitých nebo hlinitých půdách. Jak samotný český název

napovídá, místo plodů jimiž jsou tmavě hnědé tvrdé tobolky, se na této rostlině konzumují jedlé zdužnatělé stopky, které se po usušení podobají vzhledem i svoji chutí sladkým rozinkám se skořicí. Dužnaté stopky obsahují vysoké množství cukru, zatímco listy obsahují několik typů inhibitorů sladkosti^[85]. Extrakt z této rostliny je od roku 200 př.n.l. využíván v tradiční asijské medicíně pro zmírnění příznaků opilosti a také jako lék na poškozená játra^[86].

Ampelopsis grossedantata je léčivá révovitá rostlina rostoucí především v Číně. Z jejích stonků a listů v níž jsou obsaženy dva hlavní bioflavonoidy dihydromyricetin spolu s myricetinem, bývá vařen ratanový čaj, který bývá využíván v tradiční čínské medicíně. Ampelopsin, jako nejdůležitější flavonoid obsažený v ratanovém čaji, je známý díky širokému spektru pozitivních účinků. Obsah dihydromyricetinu v sušině této rostliny je více než 20 % hmotnosti^[87,88].

Širokospektré účinky dihydromyricetinu jsou stále ve fázi zkoumání a nejsou doposud přesně definovány. Nicméně, některé studie prokázaly, že dihydromyricetin vykazuje antioxidační účinky, a proto jsou navrhovány jako agens působící v různých stádiích karcinogeneze^[89]. Dále byly doloženy protizánětlivé^[90], hypoglykemické účinky^[91], a ukázalo se, že dihydromyricetin vykazuje mimo jiné i protinádorovou aktivitu^[89]. Jiné studie potvrdily jeho pozitivní vliv na funkci jaterních buněk při různých jaterních onemocnění (tzv. hepatoprotektivní efekt), které byly pozorovány u hlodavců^[89].

V současné době jsou studie, ve kterých je zkoumán vliv dihydromyricetinu na účinky alkoholu a jeho odbourávání, považovány za nejzajímavější. V nedávné studii prováděné na potkanech, kde byly zkoumány jeho účinky při současné konzumaci ethanolu, bylo prokázáno, že dihydromyricetin snižuje příznaky akutní intoxikace ethanolem (aniž by sám působil toxicky), snižuje abstinenční projevy jedince závislého na alkoholu jako jsou úzkost a přecitlivělost, a dokonce snižuje chuť na další konzumaci alkoholu^[92,93]. Z těchto důvodů by se dihydromyricetin mohl využít jako lék závislosti na alkoholu. Dihydromyricetin podporuje eliminaci alkoholu tím, že se zvyšuje aktivita alkoholdehydrogenasy a acetaldehyddehydrogenasy^[85,93], avšak aktivní složky, které jsou zodpovědné za jejich zvýšení, nebyly doposud prozkoumány. Díky svým antagonistickým působením na receptory pro kyselinu γ -aminomáselnou (GABA) v mozku, zabraňuje vazbě alkoholu na tyto receptory. Obzvláště citlivé na přítomnost ethanolu jsou receptory GABA_A^[92]. Dále bylo zjištěno, že dihydromyricetin může sloužit jako ochrana před fetálním alkoholovým syndromem, který vzniká následkem nadměrné konzumace alkoholových

nápojů v těhotenství. Jeho příčinou je ethanol, který nepříznivě ovlivňuje vývoj plodu, a to po celou dobu těhotenství ^[86].

Dihydromyricetin je nyní dostupný jako potravní doplněk, využívaný především na zmírnění příznaků kocoviny a pro jeho pozitivní efekt při akutní intoxikaci alkoholem a jeho následném odbourávání. V potravinářském průmyslu může být využit díky svým nutričním vlastnostem, ale jeho nízká rozpustnost ve vodném prostředí omezuje jeho použití jako antioxidantu a funkčního doplňku v hydrofilních potravinách. Proto se mnohé studie zabývají vznikem rozpustnějších komplexů dihydromyricetinu, kdy se nejčastěji jedná o cheláty kovů, které zlepšují vlastnosti a účinky oproti samotné molekule ^[94,95].

1.4.4.1 Interakce dihydromyricetinu s enzymy I. a II. fáze biotransformace

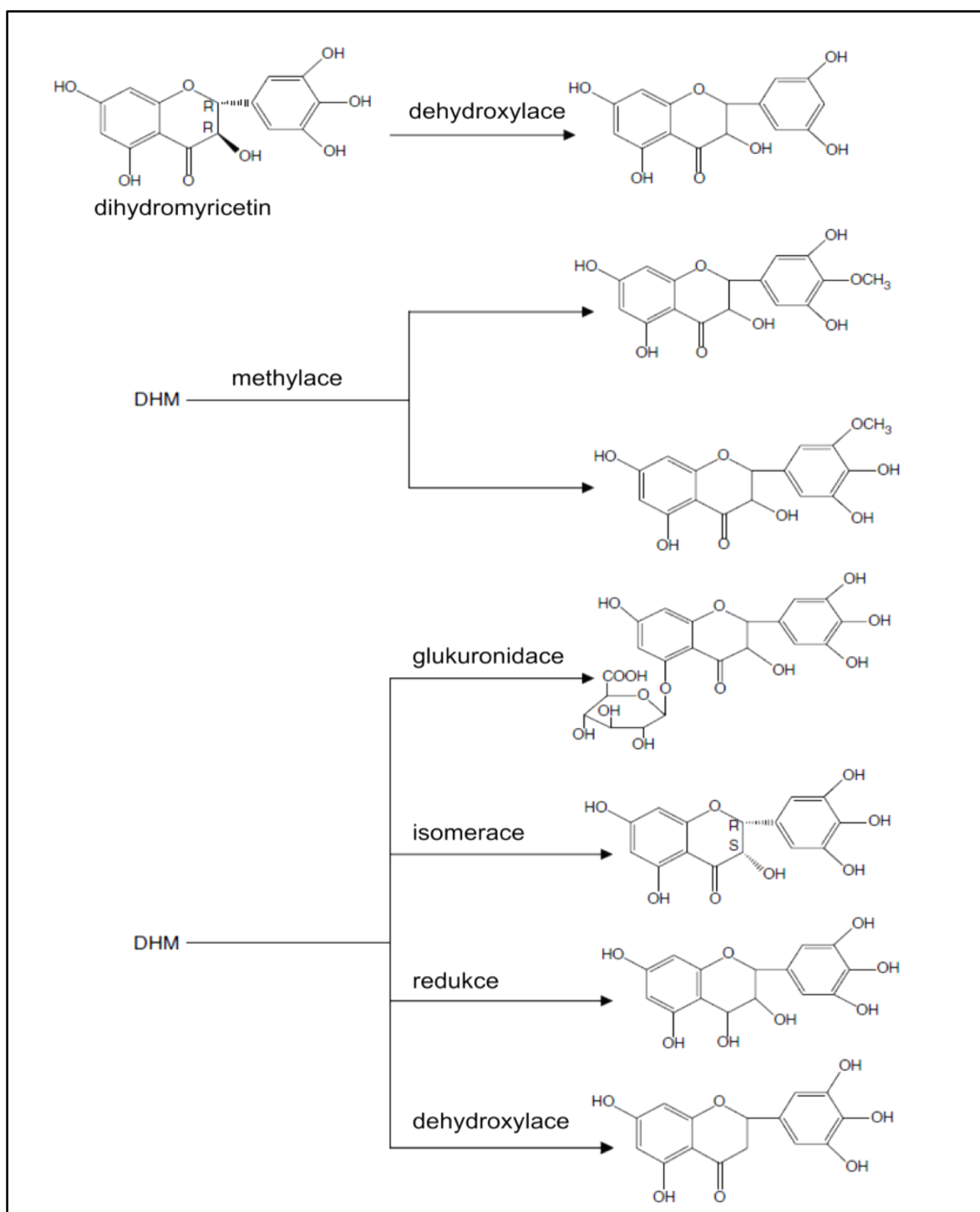
Vzhledem k tomu, že flavonoidy jsou díky přirozenému výskytu obecně považovány za látky podporující zdraví a bezpečné pro lidské použití, tak jejich rozsáhlý příjem v podobě potravinových doplňků může být spojen s nepříznivými účinky na lidské zdraví ^[96]. Již bylo zjištěno, že některé z nich vykazují mutagenní a prooxidační účinky ^[64]. Mohou působit jako modulátory enzymů první a druhé fáze biotransformace, které se podílejí na karcinogenní aktivaci. Inhibice těchto enzymů může zabránit iniciační fázi karcinogeneze. Naopak indukce nebo aktivace může mít za následek opačný účinek ^[97]. Proto je důležité zjistit, zda enzymy první a druhé fáze biotransformace jsou ovlivněny dihydromyricetinem.

Vliv dihydromyricetinu na biotransformační enzymy byl dosud studován velmi zřídka. Bylo zjištěno, že dHMR může mít vliv i na jiné enzymy druhé fáze biotransformace. Bylo zjištěno, že může působit jako induktor SULT1A1 v játrech, ale naopak může působit jako inhibitor aktivity enzymů NAT1 a NAT2 (arylamín N-acetyltransferasa) ^[97].

Dihydromyricetin může mít vliv i na enzymy první fáze biotransformace, kdy může působit jako induktor CYP3A4 a zároveň i jako inhibitor CYP2C9 na úrovni proteinu ^[98]. Dále bylo zjištěno, že má slabý účinek na aktivitu enzymu CYP1A1, CYP1A2 a CYP2B1. Dihydromyricetin slabě indukuje CYP2B1 a CYP1A2 v játrech a střední části tenkého střeva na proteinové úrovni, na úrovni genové exprese byla zjištěna indukce CYP1A1 a CYP1A2 v proximální části tenkého střeva, zatímco ve střední části indukce zaznamenána nebyla ^[99]. Tato flavonoidní sloučenina se mimo jiné podílí na tvorbě benzo[a]pyren-DNA aduktů v proximální a distální části tenkého střeva ^[96].

Metabolismu dihydromyricetinu není zcela prozkoumán a objasněn. Avšak byla provedena studie na potkanech, která prokázala přítomnost metabolitů nalezených v moči a stolici po perorálním podávání dihydromyricetinu. Pomocí metody vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) bylo identifikováno 7 různých metabolitů, které jsou znázorněny na **obrázku 7** (str. 35), kde metabolity 2-5 byly detekovány v moči, zatímco metabolity 6-8 byly detekovány ve stolici ^[100]. Získané metabolity byly charakterizovány nukleární magnetickou rezonancí (NMR) a hmotnostní spektroskopií (MS) a následně pojmenovány:

- 2) 2,5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanol,
- 3) 5,7,3',5'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavanol,
- 4) 5,7,4',5'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavanol,
- 5) dihydromyricetin-O-5-β-glukuronid,
- 6) (2R,3S)-5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavanol,
- 7) 3,4,5,7,3',4',5'-heptahydroxyflavan,
- 8) 5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavanon



Obrázek 7 Metabolity nalezené v moči a stolici po perorálním podávání dihydromyricetinu.
Převzato a upraveno z ^[100]

1.4.5 **Myricetin**

Myricetin je zástupce třídy flavonolů s oficiálním názvem 3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavon, který se přirozeně vyskytuje v různých druzích zeleniny, bylinách, bobulovinách, lískových oříšcích a také v červeném víně. Je známý pro své antioxidační účinky a jeho konzumace koreluje s nižším výskytem některých typů rakoviny ^[101]. Jeho chemická struktura je velmi podobná struktuře dihydromyricetinu, který je jeho intermediátem při biosyntetických reakcích. Strukturní odlišnost mezi těmito flavonoidy je dána přítomností dvojné vazby mezi C2 a C3 uhlíkem u myricetinu ^[102]. Na základě této blízké strukturní podobnosti, je velice zajímavé paralelně studovat oba flavonoidy z hlediska jejich biologických účinků včetně indukčního a inhibičního efektu na enzymy zodpovědné za metabolismus xenobiotik. Myricetin byl prokázán jako inhibitor enzymů první fáze biotransformace CYP3A4, CYP2C9 ^[103], avšak určitý inhibiční efekt vykazuje vůči CYP1A1 a CYP2B1 ^[99]. Dále působí i jako inhibitor enzymů druhé fáze biotransformace SULT1A1 ^[54] a arylalkylamin N-acetyltransferasy přímo v aktivním centru vázajícím acetylkoenzym A, čímž může být ovlivněna hladina melatoninu ^[104].

1.4.6 **Biochanin A**

Biochanin A, nazývaný 5,7-dihydroxy-3-(4-metoxyfenyl)chromen-4-on, je z předních zástupců isoflavonoidů, flavonoidních látek, vyskytující se v červeném jeteli (jedná se o hlavní složku) a v komerčně dostupných extraktech z této rostliny. V menším množství je obsažen v sóje a sójových produktech ^[105].

Biochanin A je v organismu metabolizován reakcemi druhé fáze biotransformace, a to konjugací s aktivním sulfátem nebo kyselinou UDP-glukuronovou v tenkém střevě a játrech. Hlavními metabolity jsou glukuronidové a sulfátové konjugáty biochaninu A. Oxidační demethylací biochaninu A vzniká farmakologicky aktivní metabolit genistein, který je další z předních flavonoidních látek. Genistein i biochanin A mohou být hydrolyzovány mikrobiální florou v gastrointestinálním traktu a jako konjugované aglykony vstřebávány do krevního řečiště ^[106,107].

Biochanin A indukuje tři isoformy sulfotransferas (SULT1A1, SULT1E1 a SULT2A1) v tenkém střevě, játrech a ledvinách potkanů ^[60].

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Primárním cílem předkládané diplomové práce bylo rozšíření současných znalostí v oblasti metabolismu flavonoidní sloučeniny dihydromyricetinu. V rámci diplomové práce byly řešeny následující problematiky:

- ❖ Vyvinutí metody separace možných metabolitů dihydromyricetinu
- ❖ Studium metabolismu dihydromyricetinu potkaním mikrosomálním systémem

Cílem této studie bylo poznání metabolismu dihydromyricetinu za využití mikrosomálního systému jater, ledvin a plic potkanů kontrolních (nepremedikovaných), tak potkanů premedikovaných různými induktory cytochromů P450.

- ❖ Studium metabolismu dihydromyricetinu potkaními a lidskými rekombinantními cytochromy P450

Dalším cílem této práce bylo určit vliv flavonoidních látek biochaninu A, myricetinu a dihydromyricetinu na genovou expresi CYP2E1, SULT1A1 v játrech a tenkém střevě laboratorních potkanů. K dosažení cíle bylo třeba splnit následující:

- ❖ Izolovat celkovou RNA z orgánů potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných flavonoidními látkami
- ❖ Převést izolovanou RNA pomocí reverzní transkripce na cDNA
- ❖ Porovnat pomocí metody kvantitativní PCR relativní expresi genů pro CYP2E1 a SULT1A1 v játrech a tenkém střevě laboratorních potkanů nepremedikovaných a premedikovaných biochaninem A, myricetinem a dihydromyricetinem a jejich kombinací.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použitý materiál a chemikálie

Chemikálie a materiál, které byly použity v experimentech, pocházejí z těchto zdrojů:

Ambion (USA) Nuclease free voda

Applied Biosystems (USA) High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

TaqMan Gene Expression Master Mix

TaqMan Gene Expression Assay:

β -aktin (Rn00667869_ml)

CYP2E1 (Rn00580624_ml)

SULT1A1 (Rn00582915_ml)

Bio Basic Inc (Kanada) TRIS, kyselina boritá, EDTA

Fermentas (Kanada) DNA marker (λ DNA EcoRI + Hind III)

Geneaid (Tchaj-wan) GENEzolTM Reagent

Invitrogen (USA) Agarosa, Trizol[®] Reagent, SYBR Green II

Lachema (ČR) Kyselina fosforečná, chlorid hořečnatý, methanol

Lach-ner (ČR) Isopropanol, ethanol, hydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan draselný, ethyacetát

Linde (ČR) Suchý led, tekutý dusík

Merck (Německo) Acetonitril

New England BioLabs (UK) Gel Loading Dye, Blue (6x)

Penta (ČR) Chloroform

Sigma (USA) Dimethylsulfoxid (DMSO), fenacetin, glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP⁺)

Sevapharma, a.s. (ČR) Hovězí sérový albumin (BSA)

Shanghai APIchemical CO. (China) Dihydromyricetin

Thermo sciences (USA) Microplate BCATM Protein Assay Kit

Potkaní a lidské rekombinantní cytochromy P450 exprimované v hmyzích buňkách transfekovaných *Baculovirem* byly získány od společnosti **BD Bioscience** respektive od společnosti **Corning (USA)**.

3.2 Použité přístroje

Analytické váhy:	DV215CD, Ohaus
Automatické pipety:	Eppendorf
Centrifugy:	Centrifuge Eppendorf 5415R Centrifuge Eppendorf 5418 Stolní minicentrifuga, Labnet
Laminární box:	Labox (BIO: 126)
Vortex:	VELP scientifica Rx ³ Vortex MS 1 Minishaker, Schoeller Pharma Praha
Termoblok:	VLMLS1
Předvážka:	440-35-N, Kern
Zdroj pro elektroforézu:	EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amerham Pharmacia Biotech
Třepačka:	Mini Rocker MR-1, Biosan
Transluminátor:	Transilluminator DR-45M, DarkReader
Spektrofotometr:	Tecan Sunrise Absorbance Reader DeNovix DS-11+
PCR cykler:	Techne, Techgene
Real-time PCR cykler:	RotorGene2000, Corbett research
Inkubátor:	IR 1500 Automatic CO ₂ Incubator, Flow Laboratories Thermomixer compact, Eppendorf
Vakuová odparka:	CentriVap Concentrator, Labconco

Systém HPLC:

Agilent technologies 1200 - čtyřkanálová peristaltická pumpa 1200, 1200 automatický dávkovač ALS G1329A, 1200 vakuový degasser G1322A, zahříváč kolony LCO102, ECOM s.r.o.,

3.3 Metody

3.3.1 Premedikace potkanů

Laboratorní potkani (samci) z kmene Wistar o hmotnosti 200-250 g byli chováni ve skupině po dvou jedincích při teplotě 22 °C (celkem 6 skupin) s 12-ti hodinovým denním režimem a s volným přístupem k potravě a vodě. Potkanům byl po dobu tří dnů jednorázově podán perorálně gaváží do žaludku biochanin A, myricetin a dihydromyricetin (popř. jejich kombinace) v dávce 60 mg/kg potkana. Kontrolní skupina potkanů byla premedikována v dávce 0,5 ml slunečnicového oleje. Den před usmrcením byla potkanům odebrána strava. Po usmrcení byly potkanům odebrány- játra a tenké střevo (rozděleno na proximální, střední a distální část). Vzorky jednotlivých tkání byly zmrazeny v kapalném dusíku a dále skladovány při teplotě -80 °C k dalšímu užití.

Experimenty byly realizovány v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (409/2008 Sb.) a vyhláškou O chovu a využití pokusných zvířat (207/2004) v prostoru Centra pro experimentální biomodely 1. LF UK (U nemocnice 478/5, Praha 2).

3.3.2 Izolace RNA

Izolace vysoce kvalitní RNA je značně náročná, jelikož se jedná o nestabilní nukleovou kyselinu a všudypřítomné ribonukleasy (RNasy) ji mohou velmi snadno hydrolyticky štěpit. Ribonukleasy nelze jednoduše eliminovat, proto je třeba při práci s RNA dodržovat preventivní opatření a vysokou čistotu^[108].

Pro izolaci RNA se používají komerčně dostupná činidla například GENEzol™ Reagent nebo TRIzol® Reagent, která byla v této diplomové práci využita. Hlavními složkami těchto činidel je monofázový roztok fenolu, chloroformu, guanidin isothiokyanátu a dalších komponent usnadňující izolaci různých typů RNA. Jedná se o činidla určená pro extrakci RNA, DNA a proteinů z celé řady vzorků například krve, plasmy, séra kultivovaných buněk a tkání. Po homogenizaci tkáně a inkubaci v činidle následuje separace fází pomocí chloroformu. Homogenát je centrifugován a vznikají tři fáze, horní vodná fáze obsahující RNA, mezifáze a spodní organická fáze obsahující DNA a proteiny^[109,110]. RNA je z vodné fáze vysrážena isopropanolem, poté promyta ethanolem k odstranění nečistot

a v závěrečném kroku je resuspendována v „*RNase free*“ resp. „*nuclease free*“ vodě (komerčně dodávaná sterilní voda, která neobsahuje nukleasy).

Všechny laboratorní pomůcky určené k izolaci RNA byly před použitím omyty 10 % (v/v) peroxidem vodíku, zabaleny do alobalu a následně sterilizovány po dobu 6 hodin při teplotě 180 °C. Celý postup izolace byl proveden v laminárním boxu (flow-box-LABOX), který byl před použitím spolu s již sterilními pomůckami vysvícen UV světlem po dobu 15 min.

Orgány byly homogenizovány v třecí misce pomocí mražení tekutým dusíkem. Ze vzniklého homogenátu byly provedeny tři paralelní izolace RNA. Jednotlivé vzorky byly rovnoměrně převedeny do 1 ml GENEzol™ Reagent, respektive 750 µl TRIzol® Reagent, přičemž na 1 ml GENEzolu™ připadá 50-100 mg tkáně ^[109] a v případě TRIzolu® přísluší 100-150 mg tkáně ^[110]. Vzorky byly následně promíchány na vortexu (Velp) a inkubovány asi 5 min při laboratorní teplotě v obrácené poloze. V dalším kroku izolace bylo přidáno 150 µl chloroformu při použití TRIzolu® nebo 200 µl při použití GENEzolu™, neboť na 1 ml obou komerčních činidel přísluší 200 µl chloroformu. RNA byla následně extrahována třepáním na vortexu (Velp) a ponechána inkubovat 3 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly vzorky odstředěny v centrifuze (Eppendorf 5415R) 15 min při 12 000 x g a teplotě 4 °C.

Po odstředění následovalo opatrné odebrání horní vodné fáze obsahující RNA do čistých mikrozkupek. Ke vzorkům byl přidán isopropanol v množství odpovídající objemu odebrané fáze s RNA. Po 10 min inkubaci při laboratorní teplotě byly vzorky centrifugovány (Eppendorf 5415R) při 12 000 x g, teplotě 4 °C po dobu 15 min. Vzniklý supernatant byl ze vzorků slit a k vytvořené peletě bylo přidáno 750 µl 75 % (v/v) ethanolu (v „*RNase free*“ vodě). Vzorky byly krátce vortexovány (VELP) a následně centrifugovány (Eppendorf 5415R) 5 min při 12 000 x g a teplotě 4 °C. Supernatant byl ze vzorků opatrně slit a pelety sušeny na termobloku (VLMLS1) do odpaření zbývajícího ethanolu.

V závěrečném kroku byly vzorky ředěny 40 µl „*RNase free*“ vodou, krátce promíchány a inkubovány 15 min při teplotě 60 °C. Izolovaná RNA byla rozpipetována na aliquoty a uchována ve vysokomrazicím boxu při teplotě -80 °C.

3.3.3 Horizontální agarosová elektroforéza

Elektroforéza na agarosovém gelu je nejúčinnější metoda pro identifikaci a separaci RNA i DNA fragmentů různých velikostech v rozmezí 100 bp do 25 kb. Polymery agarosu během tuhnutí nekovalentně asociují a vytvářejí struktury s kanály a póry, kterými biomolekuly jsou schopny procházet. Molekula RNA (DNA) je díky přítomnosti fosfátového zbytku záporně nabitá a její fragmenty v elektrickém poli migrují ke kladně nabitě anodě. Vzhledem k tomu, že RNA (DNA) má uniformní poměr hmotnost/náboj, jsou tyto biomolekuly rozděleny na základě velikosti v agarosovém gelu tak, že vzdálenost kterou urazí fragmenty je nepřímo úměrná logaritmu jejich molekulové hmotnosti. Po separaci mohou být molekuly RNA vizualizovány pomocí vhodných barviv, které jsou viditelné pod UV zářením^[111].

Pomůcky určené k elektroforéze byly před použitím sterilizovány při teplotě 180 °C po dobu 6 hod.

Bylo připraveno 40 ml 1 % (w/v) agarosového gelu v 0,5× TBE pufru (5× koncentrovaný zásobní TBE pufr; 445 mM TRIS; 445 mM kyselina boritá; 10 mM EDTA; pH 8-8,3). Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarosu a posléze ochlazena pod proudem tekoucí vody. Roztok byl vlit do aparatury na gel, kam byly umístěny hřebeny pro vytvoření jamek na vzorky. Po 30 min tuhnutí byl gel umístěn do elektroforetické aparatury a převrstven elektrodovým pufrem (0,5× TBE pufr).

Ke vzorkům izolované RNA (4 µl) byl přidán 1 µl „*RNase free*“ vody a 1 µl vzorkového pufru „6× *Loading dye*“. Dle protokolu výrobce^[112] byl připraven marker (1 µl λ EcoRI + HinDIII, 4 µl „*RNase free*“ vody a 1 µl 6× „*Loading dye*“), který byl zahříván na teplotu 65 °C po dobu 5 min a poté chlazen 3 min na ledu. Do jamek gelu byly aplikovány vzorky, marker a aparatura byla připojena ke zdroji napětí (Electrophoresis Power supply - EPS 301). Elektroforéza probíhala 45-50 min při napětí 110 V.

Po ukončení elektroforézy byl gel vložen do barvicí lázně obsahující SyberGreen II v ředění 10 000× v 1× TBE pufru (50 ml) a 30 min inkubován na třepačce (Biosan). Gel byl vizualizován na transiluminátoru (Dark Reader) v temné místnosti a vyfotografován.

3.3.4 Stanovení čistoty a koncentrace RNA

Pro stanovení čistoty a koncentrace RNA se rutinně používá absorpční spektroskopie v UV oblasti. Absorpční maximum nukleových kyselin je při vlnové délce 260 nm, zatímco bílkoviny pohlcují světlo o vlnové délce 280 nm. Absorbance RNA se většinou koriguje na absorbanci pozadí při 320 nm. Za vysoce purifikovaný preparát DNA považujeme, dosahuje-li poměr A_{260}/A_{280} hodnoty spadající do intervalu 1,8 - 2,0 ^[113].

Stanovení čistoty RNA podle poměru:

$$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$$

Stanovení koncentrace RNA podle vzorce:

$$c = \frac{A_{260} - A_{320}}{1000} \times 40 \times \text{ředění}$$

($A_{260} = 1$ odpovídá koncentraci 40 µg/ml)

Vzorek izolované RNA o objemu 5 µl byl 80× naředěn „*RNase free*“ vodou a následně bylo proměřeno absorpční spektrum v rozsahu 230-330 nm na spektrofotometru (DeNovix DS-11+).

3.3.5 Syntéza cDNA-reverzní transkripce

Reverzní transkripce je základní metodou přepisu RNA do komplementární DNA (cDNA). Reakce, při které je syntetizována cDNA z izolované RNA je katalyzována enzymem reverzní transkriptasou, což je retrovirová RNA-dependentní DNA polymerasa. Příkladem retrovirové reverzní transkriptasy je enzym izolovaný z viru ptačí myeloblastózy (AMV-RT) nebo z Moloneyova myšího leukemického viru (MMLV-RT). Reverzní transkripce využívá dvou základních oligonukleotidů, a to oligo-dT primerů a náhodných hexamerů, které nasedají na RNA templát a reverzní transkriptasa syntetizuje nové vlákno cDNA ^[114,115].

Celý postup byl proveden stejně jako v případě izolace RNA ve sterilním prostředí laminárního boxu (LABOX). Na samotnou syntézu cDNA byl použit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* ^[116].

Množství vzorku RNA vztažené na 1 µg bylo naředěno do celkového objemu 10 µl „*RNase free*“ vodou. Takto připravené vzorky byly promíchány, krátce centrifugovány na mikrocentrifuze a umístěny na led. Dále byla připravena výchozí směs obsahující na jeden vzorek:

2 µl	10× RT pufr
0,8 µl	25× dNTP mix
2 µl	10× RT Random Primers
1 µl	„ <i>RNase</i> “ inhibitor
3,2 µl	„ <i>RNase free</i> “ voda

Po aplikaci výchozí směsi k ředění RNA, byly vzorky opět lehce promíchány, krátce centrifugovány na mikrocentrifuze a umístěny na led. Z každého vzorku byly odebrány 2 µl, které sloužily jako negativní kontrola. Posledním krokem bylo přidání 1 µl reverzní transkriptasy ke všem vzorkům kromě negativních kontrol. Vzorky i negativní kontroly byly poklepem promíchány, centrifugovány na mikrocentrifuze a umístěny na led.

Připravené vzorky společně s negativními kontrolami byly umístěny do PCR cykleru (Techgene) a spuštěn program pro reverzní transkripci s následujícími teplotními podmínkami:

10 min (nasednutí náhodných hexamerů)	25 °C
120 min (prodlužování řetězce cDNA)	37 °C
5 min (inaktivace reverzní transkriptasy)	85 °C
zchlazení na 4 °C	

Po ukončení celého programu byla získaná cDNA uskladněna ve vysokomrazícím boxu při teplotě -80 °C.

3.3.6 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR)

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR) je rychle rozvíjející se metoda, která se nejčastěji využívá pro analýzu genové exprese, jelikož má široký rozsah kvantifikace v řádu 7-8 logaritmických dekád, vysokou senzitivitu (< 5 kopií), přesnost (< 2 % standardní odchylka) a sekvenční specifitu. Na rozdíl od klasické PCR, kde je amplifikovaný produkt detekován elektroforeticky až po skončení reakce, tak při PCR

v reálném čase je umožněno monitorování vznikajícího zmnoženého produktu PCR po celou dobu reakce v každém jednotlivém cyklu prostřednictvím fluorescenčního signálu. Velká výhoda této metody je schopnost kvantifikace výchozího množství požadované sekvence templátové DNA v analyzovaném vzorku ^[117].

Kvantitativní PCR (qPCR) je metoda, která shromažďuje data během celého procesu PCR. Jedná se o kombinaci amplifikace a detekce v jediném kroku, které je dosaženo použitím celé řady fluorescenčních molekul, které korelují koncentraci s intenzitou fluorescence produktu. Intenzita fluorescenčního signálu, která je měřena v každém cyklu, je přímo úměrná koncentraci produktu přítomného v reakční směsi. Tyto fluorescenční látky mohou být interkalační barviva vázající se na DNA a nebo sekvencně specifické primery a sondy ^[117,118].

V průběhu qPCR dochází k rozštěpení TaqMan sondy za využití 5'-3' exonukleasové aktivity DNA polymerasy. Jedná se o hybridizační sondu, která je složena z oligonukleotidu, který obsahuje fluorescenční barvivo na 5' konci a zhasací barvivo na 3' konci. V průběhu reakce dochází ke štěpení sondy na 5' konci na základě 5'-3' exonukleasové aktivity a následně dochází ke zvýšení fluorescenčního signálu, který je způsobený oddalováním fluorescenčního a zhasacího barviva. Tento proces probíhá v každém cyklu a zvýšení fluorescence je detekováno pouze v případě, že cílová sekvence je komplementární k sondě ^[119].

Podle fluorescenční aktivity lze amplifikační křivku rozdělit na 4 hlavní fáze: lineární fáze, časně exponenciální fáze, exponenciální fáze a fáze plató. V časně exponenciální fázi dosáhne fluorescence své prahové hodnoty detekce, kdy je vyšší oproti intenzitě fluorescence pozadí a právě tento cyklus se označuje jako C_t („*cycle threshold*“). Platí, že čím vyšší je počáteční koncentrace cDNA v reakční směsi, tím rychleji je detekována zvyšující se fluorescence produktu a tím nižší je hodnota C_t ^[117,118].

Existují dvě kvantifikační strategie pro vyhodnocení výsledků získaných metodou RT-PCR, a to absolutní a relativní kvantifikace. V případě absolutní kvantifikace je stanoven přesný počet kopií templátu ve vzorku, zatímco relativní kvantifikace porovnává změnu exprese testovacího genu vůči referenčnímu genu. Jako interní kontrola, označovaná jako „*housekeeping gen*“ se používá gen, který je přítomný ve všech buňkách a jejich hladina exprese by měla být za všech podmínek stálá a ničím neovlivněna. Relativní kvantifikace

nezjišťuje přesnou koncentraci genů, ale sleduje expresi testovacího genu, zda se zvýšila nebo naopak snížila ^[117]. Pro zjištění míry genové exprese byl v této diplomové práci použit jako srovnávací gen β -aktin.

Pro výpočet relativní kvantifikace slouží metoda tzv. delta-delta C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) bez korekce efektivity a metoda dle Pfaffla ^[120] s korekcí efektivity. U modelu bez korekce efektivity PCR se předpokládá stejná či velmi podobná teoretická účinnost amplifikace testovaného a kontrolního genu.

Vzorky cDNA a negativní kontroly byly ředěny 10× „*RNase free*“ vodou a poté poklepem promíchány, centrifugovány na mikrocentrifuze a umístěny na led. Následně byl připraven „PCR-mix“, který na jeden vzorek obsahoval:

10 μ l	„TaqMan [®] Gene Expression Master Mix“
4 μ l	„ <i>RNase free</i> “ voda
1 μ l	„TaqMan [®] Gene Expression assay“ (β -aktin resp. SULT1A1, CYP2E1)

K 15 μ l „PCR-mixu“ bylo přidáno 5 μ l ředěné cDNA a do referenčního vzorku bylo přidáno 5 μ l „*RNase free*“ vody. Každý vzorek byl proveden ve dvou paralelních stanovení. Takto připravené vzorky byly umístěny do karuselu přístroje pro „*real-time*“ PCR (Rotor Gene 2000) a za použití softwaru Rotor Gene 5 (Rotor-Gene Real-Time Analysis Software, Corbett Research 2000) byly nastaveny reakční podmínky:

2 min	50 °C (nasednutí primerů)
10 min	95 °C (aktivace DNA polymerasy)

následovalo 50 opakujících cyklů při podmínkách:

15 sec	95 °C
60 sec	60 °C

K vyhodnocení byl použit již výše zmíněný software, pomocí kterého byla určena hodnota C_t .

3.3.7 Statistické vyhodnocení polymerazové řetězové reakce v reálném čase

Z výsledků paralelních měření pro každý vzorek cDNA byl nejprve vypočten aritmetický průměr C_t (SULT1A1), C_t (CYP2E1), C_t (β -aktin), který vyjadřuje expresi daného genu v daném vzorku.

Relativní hodnota C_t , která vyjadřuje relativní zastoupení cílových genů ve vzorku, byla stanovena porovnáním hodnot testovaných genů a genu referenčního, v tomto případě s β -aktinem.

Stanovení ΔC_t podle vzorce:

$$\Delta C_{t(SULT1A1)} = C_{t(SULT1A1)} - C_{t(\beta-aktin)}$$

$$\Delta C_{t(CYP2E1)} = C_{t(CYP2E1)} - C_{t(\beta-aktin)}$$

Výsledné vyjádření míry indukce exprese genů SULT1A1 a CYP2E1 ve vzorcích dané tkáně izolované z potkanů premedikovaných biochaninem A, myricetinem, dihydromyricetinem a jejich kombinací oproti tkáni potkanů kontrolních, nepremedikovaných byla vypočtena dle uvedeného vzorce:

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-(\overline{\Delta C_t}(\text{premedikace}) - \overline{\Delta C_t}(\text{kontrola}))}$$

Statistické vyhodnocení relativní genové exprese bylo provedeno pomocí softwaru REST2009.

3.3.8 Stanovení koncentrace proteinu se 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou

Koncentrace proteinů v izolovaných mikrosomálních frakcích byla určována metodou dle Wiechelmana a spol. ^[121], při které se využívá schopnosti postranních skupin některých aminokyselin redukovat měďnaté ionty přidané do roztoku ve formě vlnanu měďnatého na ionty měďné. Kyselina 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová (BCA) tvoří modro-fialové komplexy v alkalickém prostředí s měďnými ionty, které lze stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm. Intenzita zbarvení je tedy přímo úměrná koncentraci bílkoviny v roztoku.

Ke stanovení koncentrace proteinů byl využit komerční set Microplate BCA Protein Assay Kit ^[122].

Nejdříve byly vzorky mikrosomálních frakcí vhodně naředěny vodou (10×, 20×) a následně zpracovány dle návodu výše uvedeného setu. Do 96 jamkové destičky byly pipetovány vzorky v „tripletech“ (10×, 20× naředěné mikrosomy) a „dubletech“ (standards). Do destičky byl pipetován slepý vzorek (blank-destilovaná voda), standardy BSA (hovězí sérový albumin) o koncentracích 2, 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25, 0,125 mg/ml a naředěné vzorky mikrosomů o objemu 5 µl. Poté ke každému vzorku bylo přidáno 195 µl činidla, které bylo připraveno před použitím. Tento roztok obsahoval 50 dílů činidla A (2 % (w/v) Na₂CO₃; 0,95 % (w/v) NaHCO₃; 0,4 % (w/v) NaOH; 0,16 % (w/v) vínan sodno-draselný; pH 11,25) a 1 díl činidla B (4 % (w/v) CuSO₄ · 5H₂O).

Destička se vzorky byla inkubována při 37 °C po dobu 30 minut. Po inkubaci byla destička několik minut ponechána při laboratorní teplotě a následně proměřeny absorbance při vlnové délce 562 nm na spektrofotometru (Tecan Sunrise).

Ke zpracování hodnot byl využit software KIM 32. Z kalibrační křivky standardů BSA, byly vypočítány koncentrace proteinů v mikrosomálních frakcích.

3.3.9 Studium metabolismu dihydromyricetinu potkaním mikrosomálním systémem

Metabolismus dihydromyricetinu byl studován za použití jaterních, plicních, ledvinných a střevních mikrosomů laboratorních potkanů nepremedikovaných (kontrolních) a jednak premedikovaných Sudanem I, benzo[a]pyrenem (BaP; oba induktory CYP1A1, CYP1A2), pregnenolon-16α-karbonitrilem (PCN; induktor CYP3A1/2), fenobarbitalem (PB; induktor CYP2B1/2) nebo dihydromyricetinem (dHMR). Tenké střevo bylo rozděleno na 3 části: proximální, střední a distální část. Koncentrace proteinů v jednotlivých izolovaných mikrosomálních frakcích jsou uvedeny v **tabulce 1** (str. 50).

Inkubační směsi byly připraveny pokaždé v „dubletech“ o celkovém objemu 500 µl a měly následující složení:

- ❖ 0,5 mg proteinů mikrosomální frakce
- ❖ 10 µM dihydromyricetin (10 mM zásobní roztok v DMSO)
- ❖ 10 mM MgCl₂; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP⁺
1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (NADPH-generující systém)
- ❖ Fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

Do inkubační směsi byly přidávány všechny potřebné komponenty v takovém množství, aby jejich zastoupení ve vzorku odpovídalo výše uvedeným koncentracím. Po přidání všech komponent, byla inkubační směs doplněna fosfátovým pufrem na požadovaný objem 500 µl. Reakce byla iniciována po přidání všech ostatních komponent pomocí NADPH-generujícího systému, zamíchána a inkubována po dobu 30 min za stálého třepání při 450 RPM (Thermomixer Compact, Eppendorf) v otevřených mikrozkušnicích při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační doby, byla probíhající reakce zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a následným intenzivním třepáním po dobu 2 min. Následně bylo přidáno 5 µl fenacetinu (1 mM zásobní roztok v methanolu), který slouží jako vnitřní standard pro HPLC. Jednotlivé vzorky byly extrahovány dvakrát 1 ml ethylacetátem intenzivním třepáním po dobu 2 minut. Důkladné oddělení obou fází směsi bylo provedeno za pomoci 5 minutové centrifugace (Centrifuge 5418, Eppendorf) při 13 000 RPM. Horní organická fáze (750 µl) byla po každé extrakci odebrána a ethylacetát odpařen do sucha na vakuové odparce (CentriVap Concentrator). Následně byly vysušené vzorky rozpuštěny v 25 µl methanolu a analyzovány pomocí RP-HPLC (viz. *kap. 3.3.11*). V případě studování redukčního metabolismu, byla inkubační směs nejdříve zafoukána dusíkem po dobu několika sekund a následně byla reakce iniciována pomocí NADPH-generujícího systému, zamíchána a inkubována za stejných podmínek uvedených výše v uzavřených mikrozkušnicích.

Tabulka 1 Koncentrace proteinů v izolovaných mikrosomálních frakcích potkanů použitých při experimentech.

Tkáň	Mikrosomy	Koncentrace proteinů
Plíce	Kontrolní	5,5 mg/ml
	Benzo[a]pyren	3,1 mg/ml
	Sudan I	35,0 mg/ml
Játra	Kontrolní	42,0 mg/ml
	Benzo[a]pyren	32,5 mg/ml
	Sudan I	30,0 mg/ml
	PCN	52,8 mg/ml
	PB	35,9 mg/ml
Ledviny	Kontrolní	7,4 mg/ml
	Benzo[a]pyren	8,9 mg/ml
	Sudan I	48,0 mg/ml
Střeva Proximal	Kontrolní	3,1 mg/ml
	dHMR	6,7 mg/ml
Střeva Middle	Kontrolní	4,2 mg/ml
	dHMR	4,4 mg/ml
Střeva Distal	Kontrolní	5,7 mg/ml
	dHMR	2,9 mg/ml

(PCN-pregnenolon-16 α -karbonitril, PB-fenobarbital, dHMR-dihydromyricetin)

3.3.10 Studium metabolismu dihydromyricetinu rekombinantními cytochromy P450

Při studiu oxidace dihydromyricetinu rekombinantními cytochromy P450 byly použity cytochromy P450 potkana a člověka exprimované v hmyzích buňkách (SupersomyTM). Charakteristiky potkanních a lidských cytochromů P450 jsou dostupné na webových stránkách dodavatele ^[123].

Inkubační směsi byly připraveny pokaždé v „dubletech“ o celkovém objemu 250 μ l a měly následující složení:

- ❖ 100 pmol supersomálního cytochromu P450
 - ❖ 10 μ M dihydromyricetin (10 mM zásobní roztok v DMSO)
 - ❖ 10 mM MgCl₂; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP⁺
- 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (NADPH-generující systém)

❖ Fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4)

Do inkubační směsi byly přidávány všechny potřebné komponenty v takovém množství, aby jejich zastoupení ve vzorku odpovídalo výše uvedeným koncentracím. Po přidání všech komponent, byla inkubační směs doplněna fosfátovým pufrém na požadovaný objem 250 μl . Reakce byla iniciována po přidání všech ostatních komponent pomocí NADPH-generujícího systému, zamíchána a inkubována po dobu 30 min za stálého třepání při 450 RPM (Thermomixer Compact, Eppendorf) v otevřených mikrozkušnicích při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační doby, byla probíhající reakce zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a následným intenzivním třepáním po dobu 2 min. Následně bylo přidáno 5 μl fenacetinu (1 mM zásobní roztok v methanolu), který slouží jako vnitřní standard pro HPLC. Jednotlivé vzorky byly extrahovány dvakrát 1 ml ethylacetátem intenzivním třepáním po dobu 2 minut. Důkladné oddělení obou fází směsi bylo provedeno za pomoci 5 minutové centrifugace (Centrifuge 5418, Eppendorf) při 13 000 RPM. Horní organická fáze (750 μl) byla po každé extrakci odebrána a ethylacetát odpařen do sucha na vakuové odparce (CentriVap Concentrator). Následně byly vysušené vzorky rozpuštěny v 25 μl methanolu a analyzovány pomocí RP-HPLC (viz. *kap. 3.3.11*).

3.3.11 Separace metabolitů dihydromyricetinu pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie na reverzní fázi

Mobilní fáze A: 100 % acetonitril

Mobilní fáze B: H_2O + 0,05 % (v/v) H_3PO_4

Dihydromyricetin a jeho metabolity vzniklé v inkubačních směsích byly separovány a kvantifikovány pomocí HPLC na reverzní fázi (Agilent technologies 1200) za použití gradientové eluce s mobilními fázemi acetonitrilem a destilované vody s přídavkem (0,05 % v/v) kyseliny fosforečné. Postup byl proveden dle Zhang a spol.^[124] a gradientový program je uveden v **tabulce 2** (str. 52). Metabolity dihydromyricetinu byly detekovány při vlnové délce 290 nm a 35 °C. Pro kvantifikaci byla jejich plocha vztažena k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu. Podmínky pro RP-HPLC jsou uvedeny v **tabulce 3** (str. 52).

Tabulka 2 Program eluce pro HPLC analýzu

Čas [min]	Acetonitril [% v/v]	H ₂ O + H ₃ PO ₄ [% v/v]
0	12	88
8	13	87
22	14	86
30	18	82
50	18	82
55	40	60
60	80	20

Tabulka 3 Podmínky HPLC pro separování dihydromyricetinu a jeho metabolitů

Mobilní fáze	Mobilní fáze A: 100 % acetonitril
	Mobilní fáze B: H ₂ O + 0,05 % (v/v) H ₃ PO ₄
Kolona	Nucleosil® 100-5 C18, 5 µm, 250 × 4 mm (Macherey Nagel)
Teplota kolony	35 °C
Průtok	0,6 ml/min
Nástřik	20 µl
Detekční délka	254, 290 a 370 nm

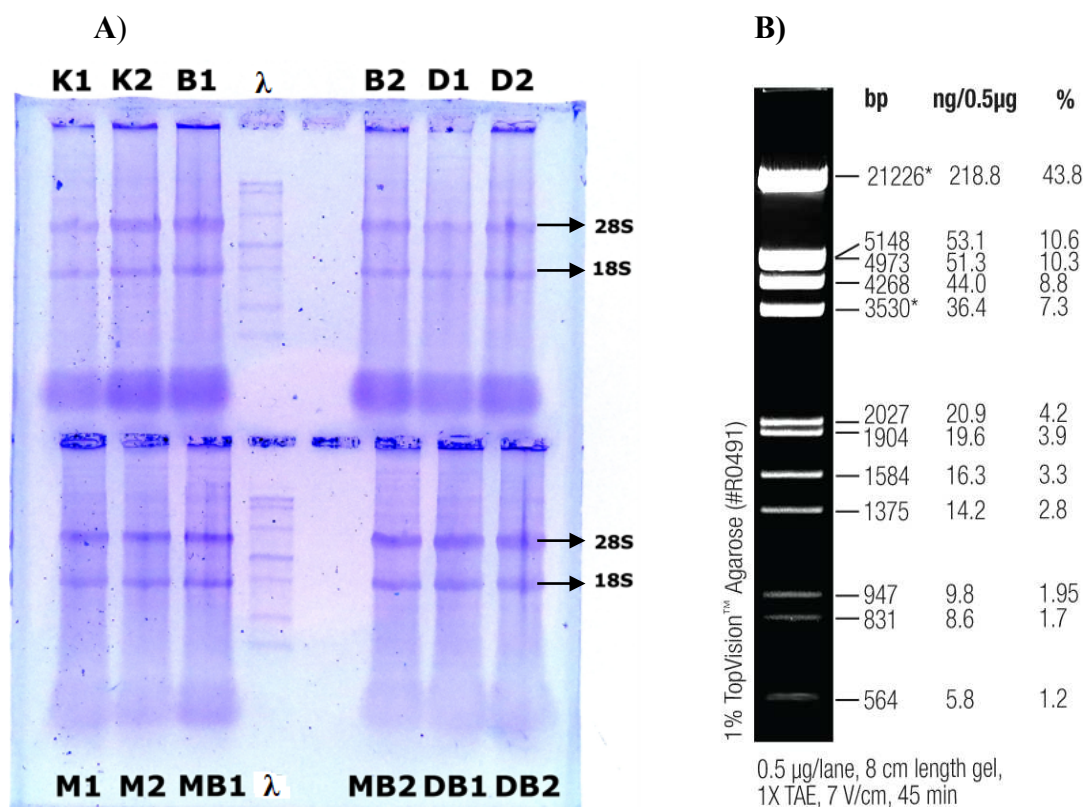
4 VÝSLEDKY

Pro stanovení míry genové exprese enzymů CYP2E1 a SULT1A1 byla v první části předkládané diplomové práce izolována celková RNA z jater a tenkého střeva z laboratorních potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a potkanů premedikovaných, kterým byl podáván biochanin A, myricetin, dihydromyricetin a jejich kombinace. Izolovaná RNA z potkaních orgánů byla v následném kroku převedena na komplementární cDNA za pomoci reverzní transkriptasy s použitím náhodných hexamerů jako primerů. V závěrečném kroku byla na získané cDNA analyzována exprese genů metodou „*real-time*“ PCR s využitím komerčních sond.

4.1 Izolace celkové RNA, stanovení čistoty a koncentrace

Izolace celkové RNA ze všech odebraných tkání potkanů kontrolních i premedikovaných biochaninem A, myricetinem, dihydromyricetinem a jejich kombinací byla provedena v třetí misce pomocí kapalného dusíku a dále s využitím jedním ze dvou komerčně dostupných činidel GENEzolTM Reagent a Trizol[®] Reagent (viz. *kap. 3.3.2*).

Pro posouzení integrity a kvality izolované RNA byla provedena horizontální elektroforéza na 1 % agarosovém gelu, na kterém byly po vizualizaci patrné dva charakteristické proužky odpovídající 28S a 18S rRNA (**obrázek 8 A** str. 54), což byl důkaz, že nedošlo k nežádoucí degradaci RNA. Pro určení velikosti RNA byl použit DNA marker (λ DNA EcoRI + Hind III)^[112] (**obrázek 8 B** str. 54).



Obrázek 8A Agarosový gel horizontální elektroforézy RNA izolované z distální části tenkého střeva potkanů kontrolních (K) a premedikovaných biochaninem A (B), dihydromyricetinem (D), myricetinem (M) a jejich kombinací. (λ -DNA marker)
Obrázek 8B DNA marker (λ DNA EcoRI + Hind III) (převzato z ^[112])

Pomocí spektrofotometrického měření absorpčních spekter byla stanovena koncentrace a čistota izolované RNA za použití vzorců uvedených v *kap. 3.3.4*. Absorpční maximum UV spektra vzorků bylo pozorováno v oblasti 260 nm, zatímco v oblasti 280 nm k nárůstu nedocházelo. Izolované preparáty byly před měřením 80× ředěny „RNase free“ vodou. Výsledné hodnoty koncentrací a míry čistoty pro jednotlivé tkáně jsou uvedeny v **tabulce 4-7** (str. 55, 56). Hodnota čistoty RNA by se měla nacházet v rozmezí 1,8-2,0, abychom mohli považovat RNA za vysoce purifikovanou ^[113].

Tabulka 4 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolované jaterní RNA

			Čistota	c [µg/µl]
JÁTRA	Kontrolní	K1 J	1,77	4,01
		K2 J	1,80	3,75
		K3 J	1,75	3,37
	Biochanin A	B1 J	1,75	1,71
		B2 J	1,80	3,02
		B3 J	1,54	1,58
	Dihydromyricetin	d1 J	1,75	2,27
		d2 J	1,77	2,56
		d3 J	1,67	2,62
	Myricetin	M1 J	1,46	0,62
		M2 J	1,24	0,40
		M3 J	1,43	0,87
	Myr +Bioch A	M+B1 J	1,64	1,43
		M+B2 J	1,78	1,34
		M+B3 J	1,44	0,86
	dHMR+Bioch A	d+B1 J	1,35	1,20
		d+B2 J	1,54	1,12
		d+B3 J	1,51	1,06

(Bioch A-biochanin A; dHMR-dihydromyricetin; Myr-myricetin)

Tabulka 5 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolované střevní (proximální) RNA

			Čistota	c [µg/µl]
PROXIMAL	Kontrolní	K1 P	1,82	6,08
		K2 P	1,86	4,91
		K3 P	1,77	3,07
	Biochanin A	B1 P	1,74	3,57
		B2 P	1,75	3,60
		B3 P	1,76	3,80
	Dihydromyricetin	d1 P	1,81	4,47
		d2 P	1,81	4,68
		d3 P	1,80	3,76
	Myricetin	M1 P	1,74	2,76
		M2 P	1,87	4,41
		M3 P	1,73	3,10
	Myr +Bioch A	M+B1 P	1,81	3,36
		M+B2 P	1,81	4,02
		M+B3 P	1,78	3,44
	dHMR+Bioch A	d+B1 P	1,79	4,19
		d+B2 P	1,76	3,86
		d+B3 P	1,76	3,71

(Bioch A-biochanin A; dHMR-dihydromyricetin; Myr-myricetin)

Tabulka 6 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolované střevní (middle) RNA

			Čistota	c [µg/µl]
MIDDLE	Kontrolní	K1 M	1,52	1,85
		K2 M	1,74	1,20
		K3 M	1,57	1,30
	Biochanin A	B1 M	1,74	2,73
		B2 M	1,83	3,14
		B3 M	1,75	2,46
	Dihydromyricetin	d1 M	1,78	3,37
		d2 M	1,61	1,74
		d3 M	1,84	2,14
	Myricetin	M1 M	1,79	1,71
		M2 M	1,79	2,35
		M3 M	1,77	4,55
	Myr +Bioch A	M+B1 M	1,82	2,48
		M+B2 M	1,80	2,84
		M+B3 M	1,89	2,37
	dHMR+Bioch A	d+B1 M	1,94	1,91
		d+B2 M	1,92	1,87
		d+B3 M	1,84	1,90

(Bioch A-biochanin A; dHMR-dihydromyricetin; Myr-myricetin)

Tabulka 7 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolované střevní (distal) RNA

			Čistota	c [µg/µl]
DISTAL	Kontrolní	K1 D	1,80	2,29
		K2 D	1,83	1,39
		K3 D	1,84	2,26
	Biochanin A	B1 D	1,67	1,13
		B2 D	1,74	2,82
		B3 D	1,72	2,41
	Dihydromyricetin	d1 D	1,79	1,96
		d2 D	1,80	1,68
		d3 D	1,66	2,35
	Myricetin	M1 D	1,73	1,84
		M2 D	1,79	1,72
		M3 D	1,85	1,85
	Myr +Bioch A	M+B1 D	1,77	2,95
		M+B2 D	1,76	1,48
		M+B3 D	1,68	2,00
	dHMR+Bioch A	d+B1 D	1,81	2,58
		d+B2 D	1,83	3,46
		d+B3 D	1,84	4,20

(Bioch A-biochanin A; dHMR-dihydromyricetin; Myr-myricetin)

4.2 Relativní kvantifikace mRNA pro SULT1A1 a CYP2E1

Pomocí reverzní transkripce byla z 1 µg RNA všech izolovaných vzorků (*kap. 3.3.5*) připravena cDNA za použití komerčního kitu *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*.

Metodou kvantitativní „*real-time*“ PCR byla stanovena míra exprese studovaných genů SULT1A1 a CYP2E1 ve výše uvedených orgánech. Stejným způsobem byla prováděna analýza všech vzorků z hlediska exprese β -aktinu jako referenčního genu, který by měl být ve všech tkáních exprimován ve stejném množství. Relativní míra genové exprese CYP2E1 a SULT1A1 vyjádřená jako $2^{-\Delta\Delta C_t}$ v jednotlivých orgánech potkanů premedikovaných Bioch A, dHMR, Myr a jejich kombinací byla porovnána s potkany nepremedikovanými a následně byl určen rozsah změny exprese cílových genů v jednotlivých premedikačních skupinách. Data byla zpracována pomocí programu REST2009 a vyhodnocena signifikace výsledků, které jsou uvedeny v **tabulkách 8, 9** (str. 58).

Tabulka 8 Relativní kvantifikace genů SULT1A1 ve vybraných orgánech potkana

Orgán	Vzorek	$\Delta\bar{C}_t^{SULT1A1} + SD$	Míra indukce $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Statistická významnost	Výsledek
Játra	Kontrolní	0,11 ± 0,33	1	-	
	Biochanin A	0,90 ± 0,70	0,75	P < 0,005***	↓
	Dihydromyricetin	1,14 ± 0,58	0,49	Nesignifikantní	
	Myricetin	2,67 ± 0,48	0,17	P < 0,005***	↓
	Myr +Bioch A	1,71 ± 0,40	0,33	P < 0,005***	↓
	dHMR+Bioch A	2,16 ± 0,36	0,24	P < 0,005***	↓
Střeva Proximal	Kontrolní	9,97 ± 0,39	1	-	
	Biochanin A	7,19 ± 1,28	6,9	P < 0,005***	↑
	Dihydromyricetin	1,12 ± 0,31	460	P < 0,005***	↑
	Myricetin	5,04 ± 2,16	30,59	P < 0,05*	↑
	Myr +Bioch A	4,76 ± 2,17	37,01	P < 0,05*	↑
	dHMR+Bioch A	ND	-	-	
Střeva Middle	Kontrolní	9,36 ± 0,13	1	-	
	Biochanin A	10,31 ± 0,13	0,53	Nesignifikantní	
	Dihydromyricetin	12,72 ± 1,19	0,10	P < 0,005***	↓
	Myricetin	2,30 ± 1,69	120	P < 0,005***	↑
	Myr +Bioch A	ND	-	-	
	dHMR+Bioch A	ND	-	-	
Střeva Distal	Kontrolní	4,12 ± 0,72	1	-	
	Biochanin A	1,86 ± 0,17	4,8	P < 0,005***	↑
	Dihydromyricetin	8,07 ± 0,26	0,07	P < 0,005***	↓
	Myricetin	9,44 ± 0,09	0,03	P < 0,005***	↓
	Myr +Bioch A	9,16 ± 0,17	0,03	P < 0,005***	↓
	dHMR+Bioch A	10,67 ± 0,59	0,01	P < 0,005***	↓

Tabulka 9 Relativní kvantifikace genů *CYP2E1* ve vybraných orgánech potkana

Orgán	Vzorek	$\Delta\bar{C}_t^{CYP2E1} + SD$	Míra indukce $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Statistická významnost	Výsledek
Játra	Kontrolní	$-3,33 \pm 0,14$	1	-	
	Biochanin A	$0,91 \pm 0,04$	0,05	$P < 0,005^{***}$	↓
	Dihydromyricetin	$-0,32 \pm 0,54$	0,13	$P < 0,005^{***}$	↓
	Myricetin	$0,16 \pm 0,18$	0,09	Nesignifikantní	
	Myr +Bioch A	$0,96 \pm 0,26$	0,05	$P < 0,005^{***}$	↓
	dHMR+Bioch A	$1,13 \pm 0,58$	0,05	$P < 0,005^{***}$	↓
Střevo Proximal	Kontrolní	$16,25 \pm 0,26$	1	-	
	Biochanin A	$16,55 \pm 0,37$	0,81	Nesignifikantní	
	Dihydromyricetin	$4,19 \pm 0,57$	4300	$P < 0,05^*$	↑
	Myricetin	$14,25 \pm 0,76$	4,00	$P < 0,05^*$	↑
	Myr +Bioch A	$7,82 \pm 1,74$	342	$P < 0,05^*$	↑
	dHMR+Bioch A	$9,43 \pm 0,78$	113	$P < 0,05^*$	↑
Střevo Middle	Kontrolní	$17,78 \pm 0,19$	1	-	
	Biochanin A	$16,70 \pm 0,17$	2,1	$P < 0,005^{***}$	↑
	Dihydromyricetin	$13,22 \pm 1,76$	24	$P < 0,005^{***}$	↑
	Myricetin	ND	-	-	
	Myr +Bioch A	ND	-	-	
	dHMR+Bioch A	ND	-	-	
Střevo Distal	Kontrolní	$6,94 \pm 0,44$	1	-	
	Biochanin A	$8,76 \pm 0,21$	0,29	$P < 0,005^{***}$	↓
	Dihydromyricetin	$18,97 \pm 0,26$	0,00	$P < 0,005^{***}$	↓
	Myricetin	$18,30 \pm 0,18$	0,00	$P < 0,005^{***}$	↓
	Myr +Bioch A	$16,56 \pm 0,18$	0,00	$P < 0,005^{***}$	↓
	dHMR+Bioch A	$19,92 \pm 0,26$	0,00	$P < 0,005^{***}$	↓

(SD-směrodatná odchylka, Bioch A-biochanin A, dHMR-dihydromyricetin, Myr-myricetin, ND-nedetkováno)

Expres *SULT1A1* byla signifikantně snížena v játrech potkanů premedikovaných biochaninem A (0,75×), myricetinem (0,17×) a kombinací biochaninu A s myricetinem (0,33×) a kombinací s dihydromyricetinem (0,24×). U samostatně podávaného dihydromyricetinu nebyla v játrech zjištěna signifikantní změna exprese. V případě *CYP2E1* bylo zaznamenáno signifikantní snížení exprese u všech premedikací s výjimkou samostatně podávaného myricetinu, u kterého byl zaznamenán pokles nesignifikantní.

Tenké střevo laboratorních potkanů premedikované:

❖ *Biochaninem A*

Signifikantní zvýšení hladiny mRNA pro *SULT1A1* byla zaznamenána v proximální části tenkého střeva (6,9×), v distální části byla míra exprese zvýšena 4,8×. Ve střední části

tenkého střeva byla naopak snížena ($0,53\times$), nicméně změna v expresi nebyla signifikantní. Signifikantní zvýšení hladiny mRNA pro CYP2E1 bylo zaznamenáno pouze ve střední části tenkého střeva ($2,1\times$), zatímco v distální části bylo zjištěno signifikantní snížení exprese ($0,29\times$) a v části proximální nebyla zjištěna signifikantní změna.

❖ *Dihydromyricetinem*

Expresе SULT1A1 byla signifikantně zvýšena pouze v proximální části, zatímco ve střední ($0,10\times$) a distální části ($0,07\times$) bylo naopak zaznamenáno její signifikantní snížení. V případě CYP2E1 byl zjištěn signifikantní nárůst exprese v proximální a střední části, zatímco v distální části bylo naopak zjištěno její snížení.

❖ *Myricetinem*

Bylo zjištěno výrazné signifikantní zvýšení exprese SULT1A1 i CYP2E1 v proximální části tenkého střeva. Naopak v distální části bylo zjištěno signifikantní snížení obou sledovaných genů.

❖ *Kombinací myricetinu s biochaninem A*

Výrazné signifikantní zvýšení hladiny mRNA pro SULT1A1 a CYP2E1 bylo pozorováno pouze v proximální části, zatímco v distální části tenkého střeva bylo zaznamenáno signifikantní snížení exprese.

❖ *Kombinací Dihydromyricetinem s biochaninem A*

V případě kombinace dihydromyricetinu s biochaninem A bylo zjištěno signifikantní snížení exprese SULT1A1 a CYP2E1 v distální části, avšak pouze v proximální části bylo zaznamenáno signifikantní zvýšení exprese CYP2E1.

4.3 Metabolismus dihydromyricetinu potkaním mikrosomálním systémem

Druhá část diplomové práce je zaměřena na metabolismus dihydromyricetinu potkaním mikrosomálním systémem. Metabolismus dihydromyricetinu byl studován *in vitro*, za použití jaterních, plicních, ledvinných a střevních mikrosomů obsahující složky monooxygenásového systému, lokalizovaného v membráně endoplazmatického retikula [7].

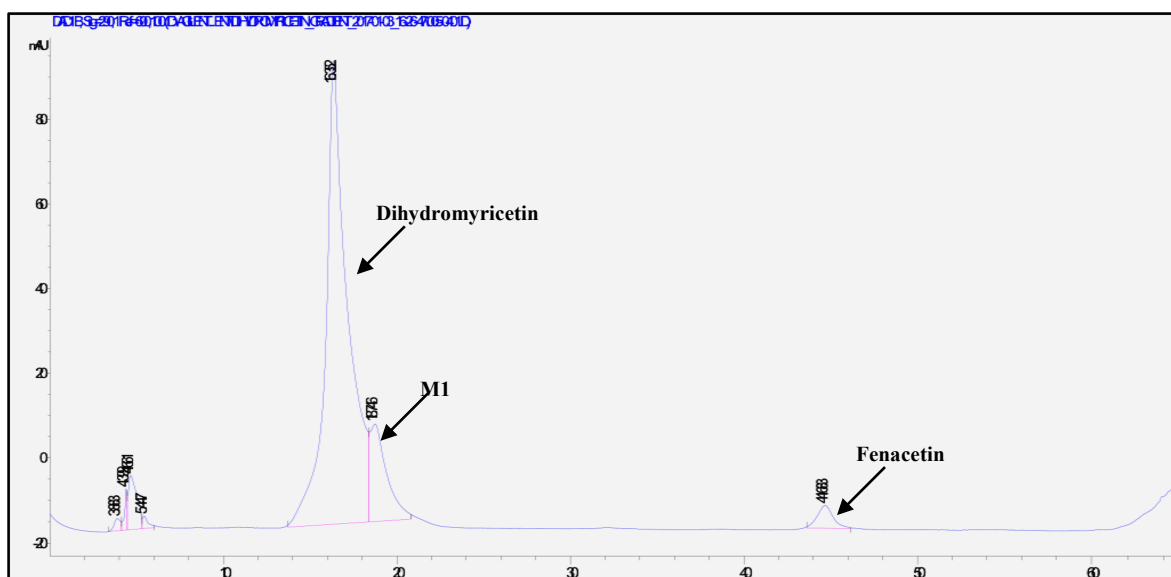
4.3.1 Oxidace dihydromyricetinu potkaním mikrosomálním systémem

Ke sledování přeměn dihydromyricetinu byly použity mikrosomální systémy potkanů jednak kontrolních (nepremedikovaných) a jednak premedikovaných Sudanem I,

benzo[a]pyrenem (B[a]P), pregnenolon-16 α -karbonitrilem (PCN), fenobarbitalem (PB) nebo dihydromyricetinem (dHMR).

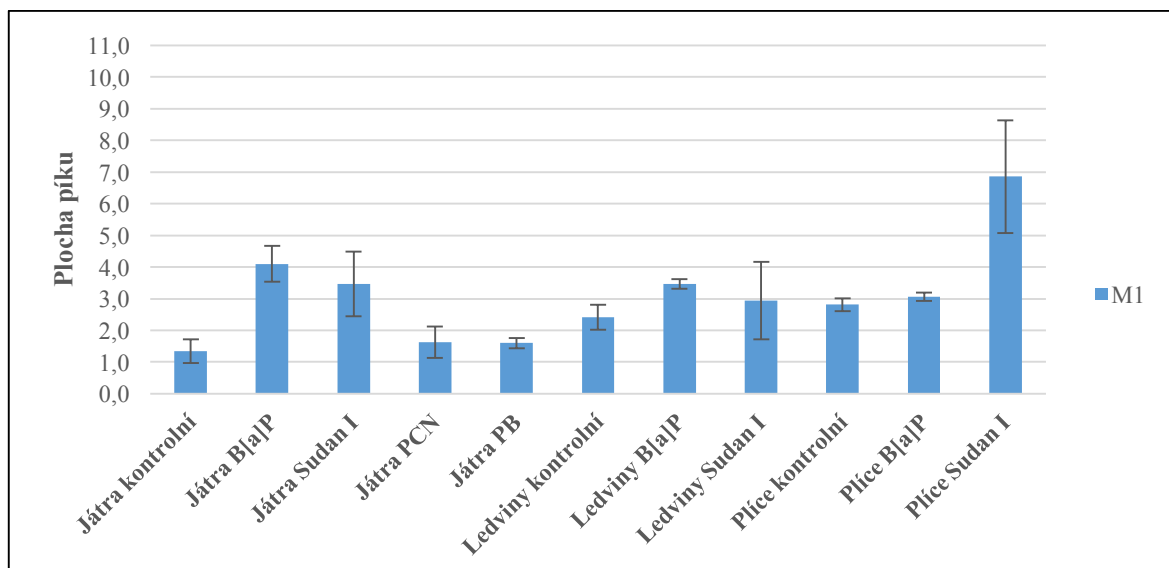
Dihydromyricetin je všemi typy použitých potkaních mikrosomů za přítomnosti NADPH-generujícího systému oxidován za tvorby jednoho metabolitu. Vzniklý metabolit byl separován pomocí RP-HPLC. Pro kvantifikaci byly plochy „píků“ metabolitů vztaženy k ploše „píku“ vnitřního standardu fenacetinu.

V průběhu oxidace dihydromyricetinu všemi výše zmíněnými mikrosomy byly separovány pomocí RP-HPLC tři „píky“ sloučenin eluované v 16 minutě, 18 minutě a 45 minutě (**obrázek 9**).



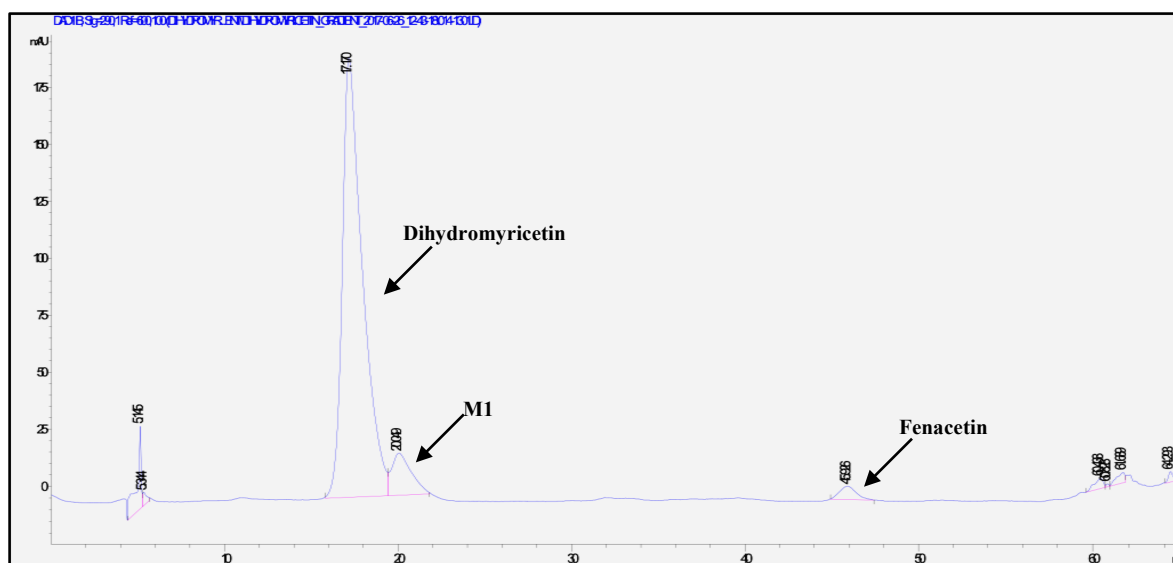
Obrázek 9 Chromatogram dihydromyricetinu a jeho metabolitu (M1) tvořeného oxidací jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných B[a]P, separovaných pomocí RP-HPLC a detekovaných při vlnové délce 290 nm.

Na **obrázku 10** (str. 61) je znázorněno množství metabolitu tvořeného oxidací mikrosomálními systémy potkanů. Vzniklý neznámý metabolit (označen M1) je tvořen mikrosomy nepremedikovaných potkanů v menší míře než mikrosomy potkanů premedikovaných různými induktory CYP. V největší míře tento metabolit vzniká použitím plicních mikrosomů potkanů premedikovaných Sudanem I a jeho plocha je až třikrát vyšší než plocha vzniklá při použití mikrosomů z kontrolních potkanů. Metabolit vzniká také ve vyšší míře v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných B[a]P a jeho plocha je oproti kontrolním jaterním mikrosomům také třikrát vyšší.



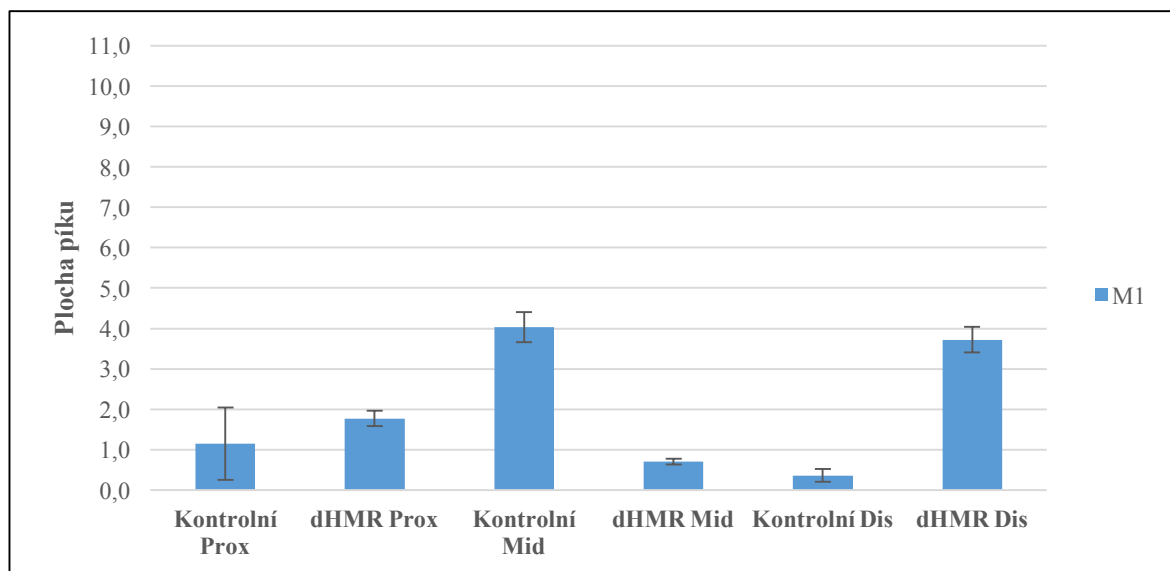
Obrázek 10 Porovnání množství vzniklého metabolitu dihydromyricetinu tvořeného oxidací mikrosomálními systémy nepremedikovaných potkanů a potkanů premedikovaných různými induktory CYP. Data v obrázku jsou průměry paralelních měření. (B[a]P-benzo[a]pyren, PCN- pregnenolon-16 α -karbonitril, PB-fenobarbital).

Ke sledování přeměn dihydromyricetinu byl také použit střevní mikrosomální systém potkanů (rozdělený na proximální, střední a distální část) kontrolních a potkanů premedikovaných dihydromyricetinem. Právě střevní a jaterní tkáň je považována za dvě hlavní místa metabolismu flavonoidů^[71]. Proto lze očekávat vznik vyššího počtu metabolitů dihydromyricetinu. Nicméně v průběhu oxidace dihydromyricetinu střevními mikrosomy byly separovány pomocí HPLC opět stejné tři „píky“ sloučenin jako v předchozím případě (obrázek 11).



Obrázek 11 Chromatogram dihydromyricetinu a jeho metabolitu (M1) tvořeného oxidací střevních mikrosomů potkanů premedikovaných dihydromyricetinem, separovaných pomocí RP-HPLC a detekovaných při vlnové délce 290 nm.

Střevní mikrosomální systém potkanů nepremedikovaných a premedikovaných dihydromyricetinem oxidují dihydromyricetin stejně jako v případě jater, plic a ledvin potkaních mikrosomů na jeden metabolit. V největší míře tento metabolit vzniká ve střední části kontrolních střevních mikrosomů, oproti mikrosomálnímu systému premedikovaných potkanů až 4× méně (**obrázek 12**). Opačně je tomu v distální části ve střevních mikrosomech premedikovaných potkanů, kde je plocha metabolitu třikrát vyšší než u systému kontrolního.



Obrázek 12 Porovnání množství vzniklého metabolitu dihydromyricetinu tvořeného oxidací střevních mikrosomů nepremedikovaných potkanů a potkanů premedikovaných dihydromyricetinem (dHMR). Data v obrázku jsou průměry paralelních měření. (Prox-proximální, Mid-střední, Dis-distální)

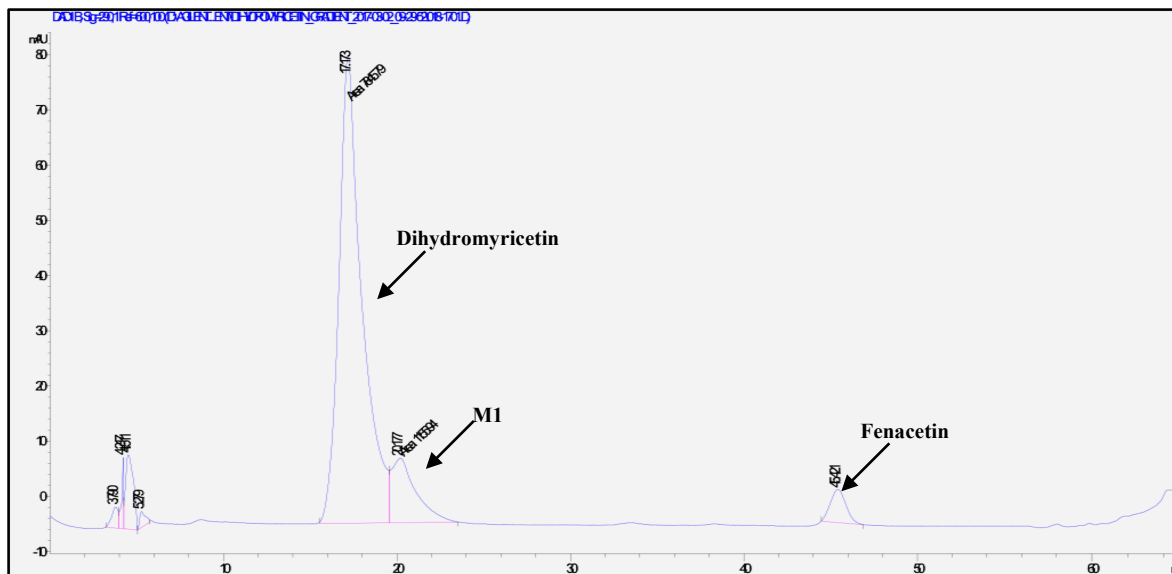
4.3.2 Redukce dihydromyricetinu potkaním mikrosomálním systémem

Kromě oxidace dihydromyricetinu potkaním mikrosomálním systémem, byl také studován i jeho redukční metabolismus. Ke sledování jeho přeměn byly použity stejné mikrosomální systémy potkanů, které byly využity v jeho oxidaci (viz. *kap. 4.3.1*).

Při redukčním metabolismu byla inkubační směs nejprve zafoukána dusíkem a posléze byla reakce iniciována přidáním NADH-generujícího systému a inkubována v uzavřených mikrozkuvkách (viz. *kap. 3.3.9*).

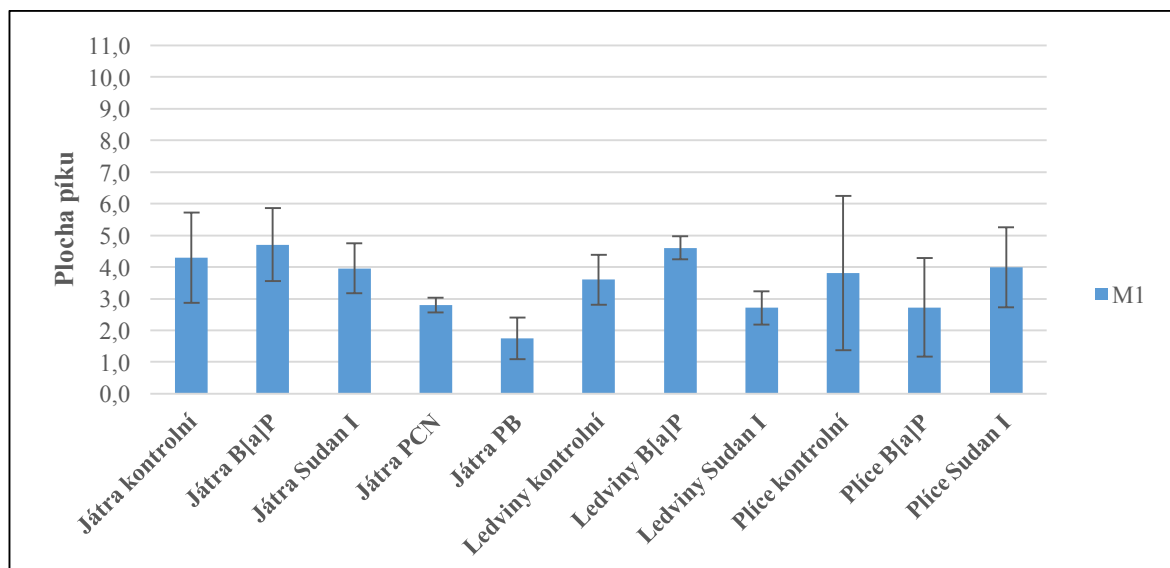
Dihydromyricetin je všemi typy použitých mikrosomů za přítomnosti NADPH-generujícího systému redukován. Vzniklý metabolit byl separován pomocí RP-HPLC. Nicméně redukcí dihydromyricetinu nevzniká větší počet jeho metabolitů, stejně jako v případě jeho oxidace. V průběhu redukce dihydromyricetinem již využitým

mikrosomálním systémem potkanů byly separovány tři „píky“ sloučenin (**obrázek 13**) a množství metabolitu tvořených tímto systémem je znázorněno na **obrázku 14** (str. 64).



Obrázek 13 Chromatogram dihydromyricetinu a jeho metabolitu (M1) tvořeného redukcí ledvinnými mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I, separovaných pomocí RP-HPLC a detekovaných při vlnové délce 290 nm.

Na **obrázku 14** (str. 64) je znázorněno množství metabolitu tvořené redukcí mikrosomálním systémem potkanů. Vzniklý neznámý metabolit (označen M1) je tvořen mikrosomy nepremedikovaných potkanů ve vyšší míře než mikrosomy potkanů premedikovaných různými induktory CYP. Toto zjištění je v porovnání s oxidací dihydromyricetinu opačné. Výjimka je pouze u jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných B[a]P, kde vzniklý metabolit má plochu vyšší oproti kontrolnímu systému mikrosomů.



Obrázek 14 Porovnání množství vzniklého metabolitu dihydromyricetinu tvořeného redukcí mikrosomálním systémem nepremedikovaných potkanů a potkanů premedikovaných různými induktory CYP. Data v obrázku jsou průměry paralelních měření. (B[a]P-benzo[a]pyren, PCN- pregnenolon-16 α -karbonitril, PB-fenobarbital)

4.4 Oxidace dihydromyricetinu potkaními a lidskými rekombinantními cytochromy P450 v SupersomechTM

Na základě výsledků z experimentů sledujících oxidaci a redukcí mikrosomálním systémem potkanů jednak kontrolních a jednak premedikovaných různými induktory cytochromů P450, lze předpokládat, že za metabolismus dihydromyricetinu zodpovídá více forem CYP.

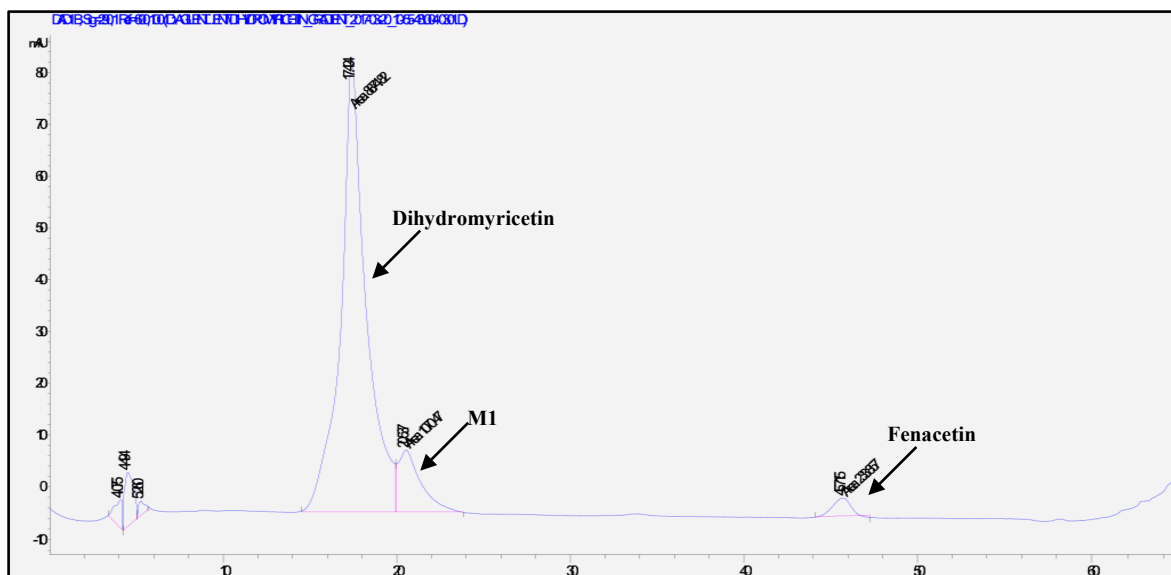
Cílem této části práce proto bylo, zjištění participace jednotlivých isoform potkaních a lidských cytochromů P450 na tomto metabolismu za použití rekombinantních cytochromů P450. Užity byly systémy exprimující jednotlivé cytochromy P450 společně s NADPH:cytochrom P450 reduktasou, případně i s cytochromem b₅, systémy mikrosomů hmyzích buněk transfekovaných Baculovirem (SupersomeTM). Přehled testovaných rekombinantních cytochromů P450 je uveden v **tabulce 10** (str. 65).

Tabulka 10 Přehled potkaních a lidských rekombinantních cytochromů P450 (SupersomyTM) užitých k analýze

Potkaní cytochromy P450	CYP1A1	Lidské cytochromy P450	CYP1A1
	CYP1A2		CYP1A2
	CYP2A1 + b ₅		CYP2A6 + b ₅
	CYP2A2 + b ₅		CYP3A4 + b ₅
	CYP3A1 + b ₅		CYP3A5 + b ₅
	CYP3A2 + b ₅		CYP4A11
	CYP2B1 + b ₅		CYP1B1
	CYP2C6 + b ₅		CYP2B6 + b ₅
	CYP2C11 + b ₅		CYP2C8 + b ₅
	CYP212 + b ₅		CYP2C9 + b ₅
	CYP2C13 + b ₅		CYP2C18
	CYP2D1		CYP2C19
	CYP2D2		CYP2E1 + b ₅
	CYP2E1 + b ₅		

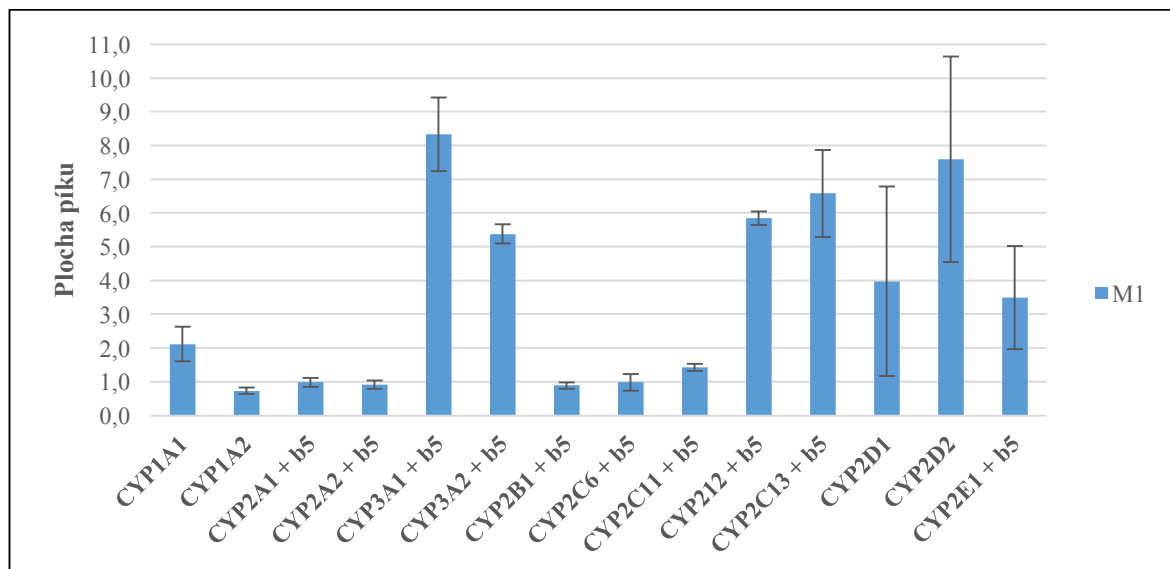
4.4.1 Oxidace dihydromyricetinu potkaními rekombinantními cytochromy P450 v SupersomechTM

Všechny testované potkaní rekombinované cytochromy P450 byly v oxidaci aktivní, kdy byl ve všech případech detekován opět pouze jeden metabolit (M1) (obrázek 15). Tento výsledek odpovídá i výsledkům získaným v experimentech s mikrosomálním systémem potkanů.



Obrázek 15 Chromatogram dihydromyricetinu a jeho metabolitu (M1) tvořeného oxidací potkaním cytochromem P450 2E1, separovaného pomocí RP-HPLC a detekovaného při vlnové délce 290 nm.

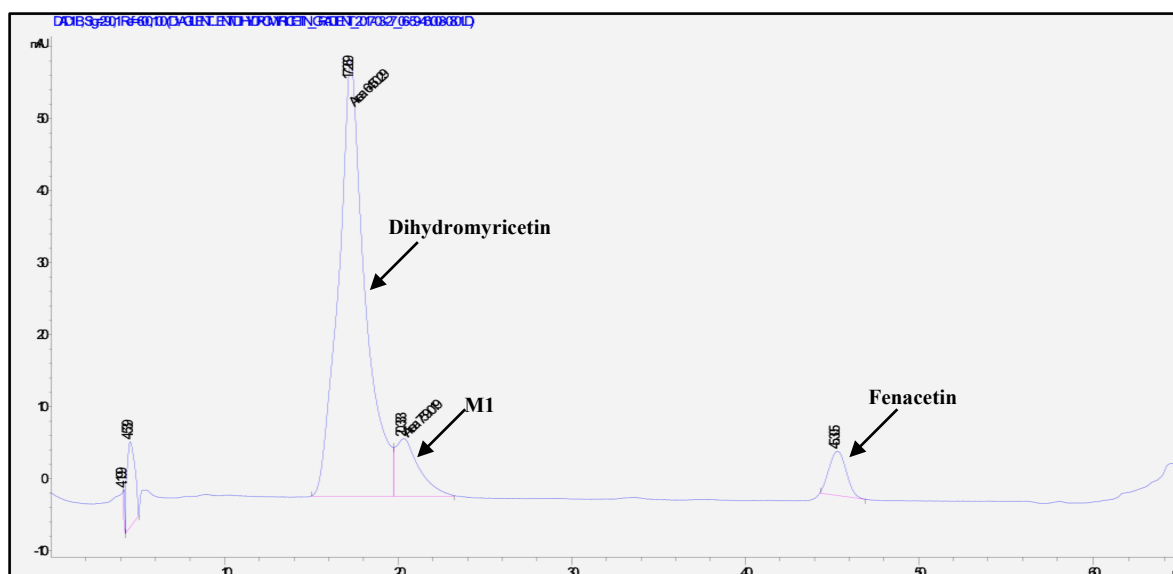
Ze všech použitých potkaních rekombinantních cytochromů P450 byl v oxidaci dihydromyricetinu nejvíce efektivní cytochrom P450 3A1 s přítomností cytochromu b₅ (**obrázek 16**), následovaný CYP2D2 bez přítomnosti cytochromu b₅ a CYP2C12 a CYP2C13.



Obrázek 16 Porovnání množství metabolitu dihydromyricetinu tvořeného oxidací potkaními cytochromy P450 exprimovanými v hmyzích buňkách (SupersomyTM). Data v obrázku jsou průměry měření.

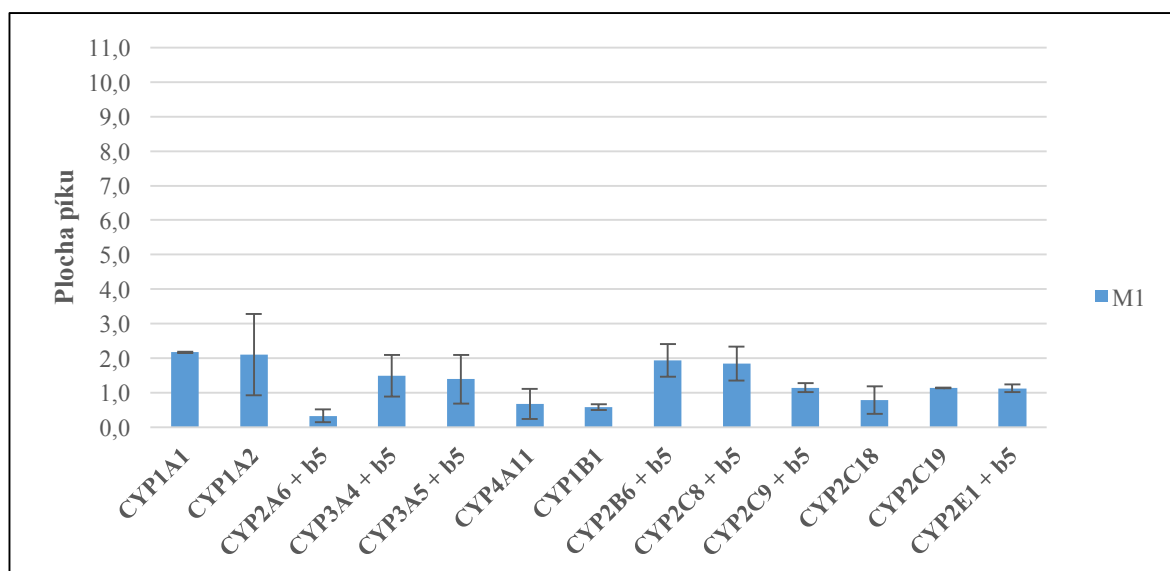
4.4.2 Oxidace dihydromyricetinu lidskými rekombinantními cytochromy P450 v SupersomechTM

Všechny testované lidské rekombinované cytochromy P450 byly v oxidaci aktivní, kdy byl ve všech případech detekován pouze jeden metabolit (M1) (**obrázek 17** str. 67). Tento výsledek odpovídá i výsledkům jednak získaných v experimentech s mikrosomálním systémem potkanů a jednak v experimentech s potkaními cytochromy P450 exprimovanými v hmyzích buňkách (SupersomyTM).



Obrázek 17 Chromatogram dihydromyricetinu a jeho metabolitu (M1) tvořeného oxidací lidským cytochromem P450 1A2, separovaného pomocí RP-HPLC a detekovaného při vlnové délce 290 nm.

Ze všech použitých lidských potkaních cytochromů P450 exprimovaných v hmyzích buňkách (SupersomyTM) byly v oxidaci dihydromyricetinu nejvíce efektivní cytochromy P4501A1 a 1A2 bez přítomnosti cytochromu b₅ (**obrázek 18**). Z cytochromů P450 genové rodiny 2 byl efektivní CYP2B6 a CYP2C8 s přítomností cytochromu b₅.



Obrázek 18 Porovnání množství metabolitu dihydromyricetinu tvořeného oxidací lidskými cytochromy P450 exprimovanými v hmyzích buňkách (SupersomyTM). Data v obrázku jsou průměry měření.

5 DISKUSE

V poslední době se rozšířilo užívání přírodních chemopreventivních sloučenin ve formě potravinových doplňků. Mezi tyto chemopreventivní sloučeniny se řadí flavonoidní sloučeniny, které jsou díky přírodnímu původu považovány za zdraví prospěšné látky, neboť vykazují mnoho pozitivních účinnů na lidský organismus. I přes přírodní původ flavonoidních sloučenin se stále jedná o cizorodé látky, tedy látky tělu nevlastní, které mohou mít vedle prospěšného působení i řadu dalších biologických účinků ^[64]. Vědecké studie se převážně zabývají hledáním pozitivních efektů daných přírodními látkami, zatímco studium možných negativních důsledků konzumace těchto, pro tělo cizorodých látek, je kladen menší význam. Mimo jiné tyto látky mohou ovlivnit endogenní metabolismus a též i aktivitu enzymů první a druhé fáze biotransformace, které jsou významné pro bezpečnou detoxikaci xenobiotik přijímaných z vnějšího okolí. Některé biotransformační enzymy se mohou naopak podílet na aktivaci karcinogenů ^[7]. Mezi enzymy první fáze biotransformace patří i cytochromy P450 a druhé fáze např. cytosolární sulfotransferasy (SULT). Flavonoidní látky prostřednictvím indukce těchto enzymů a stimulace jejich aktivity mohou podpořit toxické a karcinogenní procesy, a tím i riziko vzniku rakoviny ^[2].

Předkládaná diplomová práce navazuje na dosavadní studie věnující se studiu flavonoidní sloučeniny dihydromyricetinu a jeho vlivu na cytochromy P450 a cytosolární sulfotransferasy, které vznikly v laboratořích PřF UK. Navazuje zejména na rigorozní práci RNDr. Michaely Bébové ^[125], ve které byl zkoumán vliv vybraných přírodních látek ze skupiny flavonoidů na expresi a aktivitu enzymu sulfotransferasy 1A1 a na diplomovou práci Mgr. Zdislavy Boštíkové ^[126], ve které byl studován vliv flavonoidů na aktivitu (indukce, inhibice) CYP2E1. Dále tato práce navazuje na dosavadní studie týkající se metabolismu dihydromyricetinu. Cílem této diplomové práce je jednak doplnit dříve získané výsledky genových expresí CYP2E1 a SULT1A1 v orgánech laboratorního potkana premedikovaného vybranými flavonoidními sloučeninami a jednak rozšířit poznatky o metabolismu dihydromyricetinu.

Dihydromyricetin je přírodní sloučenina, která vykazuje mnoho pozitivních účinků na lidský organismus. Do povědomí se dostal jako potenciální léčivo závislosti na alkoholu a také jako atraktivní potravní doplněk pro lidi konzumující ve větší míře jednorázově alkohol ^[92]. Myricetin je strukturně dihydromyricetinu velmi podobný (liší se dvojnou

vazbou mezi atomy uhlíku C2 a C3), na rozdíl od něj se jedná o běžný rostlinný flavonoid a běžně se vyskytující v lidské stravě ^[102]. Z toho důvodu je zajímavé sledovat případnou korelaci v modulačních efektech na SULT1A1 a CYP2E1. Biochanin A byl do této práce zahrnut jako referenční flavonoidní sloučenina, u které byla popsána schopnost indukovat SULT1A1 ^[60].

V první části diplomové práce byl zkoumán vliv vybraných přírodních látek ze skupiny flavonoidů, jmenovitě biochaninu A, myricetinu, dihydromyricetinu a jejich kombinací, na genovou expresi cytochromu P450 2E1 a sulfotransferasy 1A1 v játrech a tenkém střevě laboratorního potkana. Byla izolována celková RNA za využití komerčně dostupných činidel GENEzol™ Reagent a TRIzol® Reagent. Pomocí metody reverzní transkripce byly vzorky RNA převedeny na cDNA.

Kvantifikací mRNA byla zjištěna indukce CYP2E1 a SULT1A1 v proximální části tenkého střeva a zároveň bylo zjištěno, že dochází k významnému snížení exprese obou enzymů v játrech. Také bylo zjištěno signifikantní zvýšení exprese CYP2E1 ve střední části tenkého střeva všech premedikovaných potkanů.

Prvním studovaným byl cytochrom P450 2E1, který je enzymem první fáze biotransformace a je zapojený do metabolismu cizorodých látek jako je ethanol. Jedná se o konstitutivní enzym vyskytující se ve vyšších koncentracích v játrech, je však indukovatelný řadou látek, které jsou většinou i substráty tohoto enzymu ^[27]. Z výsledků je patrné, že exprese CYP2E1 byla signifikantně snížena v játrech u všech premedikovaných skupin kromě skupiny premedikované myricetinem, kde byl zaznamenán pokles nesignifikantní. Což odpovídá i zjištěním ve studii vlivu dihydromyricetinu na expresi výše zmiňovaného proteinu, kde v játrech potkana po premedikaci dihydromyricetinem nebyla zjištěna žádná modulace ani aktivity ani exprese na úrovni proteinu ^[126]. Naopak, významná indukce byla nalezena v tenkém střevě, a to v proximální části, při použití premedikace dihydromyricetinem byla v řádech tisíců, v případě podání kombinace s biochaninem A byla snížena na úroveň stovek. Odlišný průběh můžeme pozorovat v případě premedikace myricetinem, kde podáním kombinace myricetin s biochaninem A dochází ke zvýšení z jednotek (podání samotného Myr) na stovky. Tyto výsledky ovšem nekorelují s výsledky zjištěnými na proteinové úrovni. Vysvětlením může být různá citlivost použitých metod (RT-PCR versus „Western Blot“). Indukční efekt byl pozorován ve střední části tenkého

střeva potkanů premedikovaných biochaninem A a dihydromyricetinem. V Distální části tenkého střeva byl zaznamenán signifikantní pokles genové exprese u všech použitých premedikací.

Další studovanou byla sulfotransferasa 1A1, konjugální enzym, který se především podílí na metabolismu xenobiotik a společně s SULT1B1 zodpovídají za téměř 70 % sulfotransferasové aktivity ^[56]. Kvantifikací mRNA bylo zjištěno, že vlivem dihydromyricetinu dochází ke zvýšení genové exprese pouze v proximální části střeva potkana, naproti tomu ve střední a distální části dochází k významnému snížení. Při podání kombinace s biochaninem A, prokázaným induktorem SULT1A1^[60], nedocházelo k významným změnám oproti samostatně podávanému dihydromyricetinu. Naproti tomu, docházelo ke snížení exprese v případě kombinace dHMR+Bioch A oproti podání Bioch A, který v proximální části střeva vyvolal zvýšení exprese v řádech jednotek. Vliv myricetinu byl pozorován na dvou frontách, a to jako zvýšení exprese v proximální (30×) a střední (120×), naopak snížení bylo nalezeno v játrech a distální části tenkého střeva. V kombinaci s biochaninem A nedochází v žádném ze studovaných orgánů ke změně exprese ve srovnání se samostatným podáním myricetinu. Námi získané výsledky neodpovídají výsledkům získaným M. Bebovou ve studii vlivu flavonoidních sloučenin na expresi SULT1A1 na proteinové úrovni, ve které byla zjištěna výrazná změna v proteinové expresi při podání kombinace dihydromyricetinu s biochaninem A a téměř žádný vliv nebyl zaznamenán v ostatních použitých orgánech ^[125].

Důvodem těchto rozdílných výsledků může být i způsob rozdělování tenkého střeva na jednotlivé části, a stejně tak i různou citlivostí použitých metod. Případně je zde i možnost, že mohlo dojít ke kontaminaci našich vzorků RNA genomickou DNA, což by mělo za následek zkreslení výsledků.

Druhá část diplomové práce je věnována metabolismu dihydromyricetinu, který byl studován *in vitro*, za použití jaterních, plicních, ledvinných a střevních mikrosomů. Ke sledování přeměn dihydromyricetinu byly použity mikrosomální systémy potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a jednak premedikovaných různými induktory CYP. Následně byl metabolismus dihydromyricetinu studován za použití potkaních a lidských rekombinantních cytochromů P450 v SupersomechTM.

Metabolismus dihydromyricetinu *in vitro* není zcela prozkoumán a objasněn. Většina výzkumů se zabývá především jeho účinky na lidský organismus a na jeho metabolismus je

kladen menší důraz. Ve studii provedené *in vivo* na potkanech, kterým byl perorálně podáván dihydromyricetin byla prokázána přítomnost metabolitů v moči a stolici ^[100].

V této práci byl metabolismus studován jaterními, plicními, ledvinnými a střevními mikrosomálními systémy potkanů, a to jak za přístupu vzduchu, tak i za jeho nepřítomnosti (pouze játra, ledviny a plíce). Dále byly využity systémy jednotlivých potkaních a lidských CYP exprimovaných v hmyzích buňkách (SupersomyTM). Při použití jakéhokoli systému, vždy vznikl pouze jeden metabolit, který byl separován pomocí RP-HPLC a detekován při vlnové délce 290 nm. Takto vzniklý metabolit nebyl z časových důvodů charakterizován. Metabolit je tvořen kontrolními mikrosomy v menší míře než mikrosomy potkanů premedikovaných různými induktory CYP. V nejvyšší míře vzniká v plicních mikrosomech potkanů premedikovaných Sudanem I a v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných B[a]P. Při studiu metabolismu bez přístupu vzduchu (redukční podmínky) výše uvedenými mikrosomálními systémy, vznikl opět stejný metabolit, který je tvořen kontrolními mikrosomy ve vyšší míře než mikrosomy potkanů premedikovaných různými induktory CYP. Výjimka je pouze u jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných B[a]P, kde je vzniklý metabolit zastoupen v nepatrně vyšší míře než u kontrolního systému.

V případě srovnání vzniku neznámého metabolitu tvořeného oxidací a redukcí mikrosomálním systémem potkanů nepremedikovaných a premedikovaných různými induktory CYP, lze konstatovat, že neznámý metabolit je redukcí tvořen ve větší míře u nepremedikovaných potkanů oproti metabolitu tvořeného oxidací. U jaterních mikrosomů je metabolit tvořen redukcí ve vyšší míře, než jeho oxidací. U ledvinných mikrosomů je metabolit naopak tvořen oxidací ve vyšší míře a stejně tomu je tak i u plicních mikrosomů.

Ke sledování přeměn dihydromyricetinu byl použit i střevní mikrosomální systém potkanů (rozdělený na proximální, střední a distální část) kontrolních a potkanů premedikovaných dihydromyricetinem. Právě střevní a jaterní tkáň je považována za dvě hlavní místa metabolismu flavonoidů. Střevní mikroflóra přeměňuje flavonoidy na „volné“ flavonoidy (aglykony) nebo fenolické kyseliny ^[71]. Druhým místem je jaterní tkáň, která je bohatá na enzymy I. a II. fáze biotransformace. Aglykony postupně podléhají reakcím I. fáze biotransformace a následně jsou podrobeny konjugacním reakcím, které vedou ke zvýšení molekulové hmotnosti a zlepšení rozpustnosti, což zvyšuje vylučování sloučeniny ve žluči nebo moči ^[64,73]. Střevní mikrosomální systém potkanů nepremedikovaných a premedikovaných dihydromyricetinem přeměňují dihydromyricetin opět na stejný metabolit, který vzniká v největší míře ve střední části kontrolních střevních mikrosomů,

zatímco u premedikovaného mikrosomálního systému vzniká velmi zřídka. Opačně je tomu v distální části střevních mikrosomů.

Ze všech použitých potkaních rekombinantních cytochromů P450 se nejvíce metabolitu tvořilo za použití potkaního rekombinantního cytochromu P450 3A1 v přítomnosti cytochromu b₅. U lidských potkaních cytochromů P450 se nejvíce metabolitu tvořilo u rekombinantního cytochromu P450 1A1/1A2 bez přítomností cytochromu b₅.

Oproti studii, ve které bylo detekováno sedm různých metabolitů ^[100] (viz *kap. 1.4.4.1*), byl v této práci detekován pouze jeden metabolit. Vysvětlením tohoto výsledku je, že ve studii byly metabolity nalezeny v moči a stolici potkanů, což znamená, že metabolismus dihydromyricetinu proběhl v komplexním systému potkana na rozdíl od námi použitého velmi ohraničeného mikrosomálního systému popř. konkrétních isoform CYP. Výsledky získané v této práci potvrzují předpoklad, že dihydromyricetin je majoritně metabolizován enzymy II. fáze biotransformace, což naznačuje i jeho vysoce hydroxylovaná struktura. Jak již bylo řečeno, zatím nebyl metabolismus dihydromyricetinu zkoumán na úrovni enzymů I. fáze biotransformace, proto tato práce přispívá k rozšíření vědomostí o metabolismu *in vitro* a následně i k nasměrování dalších studií.

Ze získaných výsledků této diplomové práce vyplývá, že dihydromyricetin nijak významně neovlivňuje expresi sledovaných genů v játrech, naproti tomu významný nárůst genové exprese jak SULT1A1, tak CYP2E1 byl nalezen v proximální části tenkého střeva, tedy v hlavních orgánech, ve kterých dochází k metabolismu flavonoidních látek. Dihydromyricetin tedy nelze považovat za bezpečný prostředek z hlediska jeho možnosti zapojení do indukce biotransformačních enzymů a následného zvýšení aktivity prokarcinogenů.

6 SHRNU TÍ A ZÁV Ě R

V této diplomové práci zaměřené na studium vlivu vybraných flavonoidních látek na genovou expresi CYP2E1 a SULT1A1 v játrech a tenkém střevě potkanů a na studium metabolismu dihydromyricetinu potkaním mikrosomálním systémem a potkaními a lidskými rekombinantními cytochromy P450, bylo dosaženo následujících výsledků:

- ❖ Kvantifikace mRNA potvrdila indukci CYP2E1 a SULT1A1 v proximální části tenkého střeva.
- ❖ Signifikantní zvýšení exprese CYP2E1 ve střední části tenkého střeva všech premedikovaných potkanů.
- ❖ Signifikantní snížení hladiny mRNA pro oba studované enzymy v distální části tenkého střeva s výjimkou potkanů premedikovaných biochaninem A, kde bylo naopak pozorováno signifikantní zvýšení exprese SULT1A1 v této části tenkého střeva.
- ❖ Při oxidaci nebo redukci dihydromyricetinu mikrosomálním systémem potkanů nepremedikovaných a potkanů premedikovaných různými induktory CYP byl detekován pouze jeden metabolit. V případě oxidace je tento metabolit tvořen mikrosomy nepremedikovaných potkanů v menší míře než mikrosomy premedikovaných potkanů. Při redukci je metabolit tvořen mikrosomy nepremedikovaných potkanů naopak ve vyšší míře.
- ❖ Střevní mikrosomální systém potkanů nepremedikovaných a premedikovaných dihydromyricetinem oxidují dihydromyricetin na jeden metabolit, který je v největší míře zastoupen ve střední části kontrolních střevních mikrosomů.
- ❖ Při oxidaci dihydromyricetinu potkaními a lidskými rekombinantními cytochromy P450 v SupersomechTM byl detekován opět jeden metabolit. V oxidaci dihydromyricetinu byl nejvíce efektivní potkaní CYP3A1 a lidský CYP1A1 a CYP1A2.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Leslie, E.M.; Deeley, R.G.; Cole, S.P. Multidrug resistance proteins: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *204*, 216–37.
2. Le Marchand, L.; Murphy, S.P.; Hankin, J.H.; Wilkens, L.R.; Kolonel, L.N. Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 154–60.
3. Ross, J.A.; Kasum, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* **2002**, *22*, 19–34.
4. Hodek, P.; Tepla, M.; Krizkova, J.; Sulc, M.; Stiborova, M. Modulation of cytochrome P450 enzyme system by selected flavonoids. *Neuroendocrinol. Lett.* **2009**, *30*, 67–71.
5. Knejzlík, Z.; Káš, J.; Ruml, T. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy.* **2000**, *94*, 913–18.
6. Kramer, S.D.; Testa, B. The biochemistry of drug metabolism-an introduction: part 7. Intra-individual factors affecting drug metabolism. *Chem. Biodivers.* **2009**, *6*, 1477–660.
7. Stiborová, M.; Hudeček, J.; Páca, J.; Martínek, V. Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy.* **2004**, *98*, 876–90.
8. Okey, A.B.; Roberts, E.A.; Harper, P.A.; Denison, M.S. Induction of drug-metabolizing enzymes: mechanisms and consequences. *Clin. Biochem.* **1986**, *19*, 132–41.
9. Chromá, L.; Macková, M.; Macek, T.; Martínek, V.; Stiborová, M. Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chem. Listy.* **2001**, *95*, 212–22.
10. Lamb, D.C.; Lei, L.; Warrilow, A.G.; Lepesheva, G.I.; Mullins, J.G.; Waterman, M.R.; Kelly, S.L. The first virally encoded cytochrome p450. *J. Virol.* **2009**, *83*, 8266–9.
11. Xia, X.L.; Fa, B.T.; Cong, S.; Wang, J.F.; Chou, K.C. Research/review: Insights into the mutation-induced dysfunction of arachidonic acid metabolism from modeling of human CYP2J2. *Curr. Drug. Metab.* **2014**, *15*, 502–13.

12. Walkowska, A.; Thumová, M.; Škaroupková, P.; Husková, Z.; Vaňourková, Z.; Chábová, V.Č.; Tesař, V.; Kramer, H.J.; Falck, J.R.; Imig, J.D.; Kompanowska-Jezierska, E.; Sadowski, J.; Červenka, L. Intrarenal CYP-450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of the nonclipped kidney function in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertensive rats. *J. Hypertens.* **2010**, *28*, 582–93.
13. Stiborová M.: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, *Sborník multioborového semináře „Otevřená věda“* z 22. – 29. 10. **2005**, Praha
14. Hamadeh, H.; Afshari, C. *Toxicogenomics: Principles and Applications*. **2004**.
15. Kalgutkar, A.S.; Gardner, I.; Obach, R.S.; Shaffer, C.L.; Callegari, E.; Henne, K.R.; Mutlib, A.E.; Dalvie, D.K.; Lee, J.S.; Nakai, Y.; O'Donnell, J.P.; Boer, J.; Harriman, S.P. A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. *Curr. Drug. Metab.* **2005**, *6*, 161–225.
16. Jancova, P.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **2010**, *154*, 103–16.
17. Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J. *Farmakochemie*; VŠCHT, **2007**.
18. Stiborová, M.: Xenobiochemie, přednáška na PřF UK, katedra biochemie, Praha, **2016**.
19. Hannemann, F.; Bichet, A.; Ewen, K.M.; Bernhardt, R. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Acta. Biochim. Biophys.* **2007**, *1770*, 330–44.
20. Stiborová, M. Aromatické nitrosloučeniny: Kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka. *Chem. Listy.* **1999**, *96*, 784–91.
21. de Wildt, S.N.; Kearns, G.L.; Leeder, J.S.; van den Anker, J.N. Glucuronidation in humans. Pharmacogenetic and developmental aspects. *Clin. Pharmacokinet.* **1999**, *36*, 439–52.
22. Hinchman, C.A.; Matsumoto, H.; Simmons, T.W.; Ballatori, N. Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid. Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 22179–85.
23. Coon, M.J. Oxygen activation in the metabolism of lipids, drugs and carcinogens. *Nutr. Rev.* **1978**, *36*, 319–28.

24. Chen, G.M.; Bray, T.M.; Janzen, E.G.; McCay, P.B. The role of mixed function oxidase (MFO) in the metabolism of the spin trapping agent alpha-phenyl-N-tert-butyl-nitron (PBN) in rats. *Free Radical Res. Commun.* **1991**, *14*, 9–16.
25. Hamdane, D.; Zhang, H.; Hollenberg, P. Oxygen activation by cytochrome P450 monooxygenase. *Photosynth. Res.* **2008**, *98*, 657–66.
26. Kotrbová, V.; Aimová, D.; Ingr, M.; Borek-Dohalská, L.; Martínek, V.; Stiborová, M. Preparation of a biologically active apo-cytochrome b5 via heterologous expression in Escherichia coli. *Protein Expression Purif.* **2009**, *66*, 203–9.
27. Stiborová, M.; Hudeček, J.; Hodek, P.; Frei, E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy.* **1999**, *93*, 229–37.
28. Nebert, D.W.; Nelson, D.R.; Feyereisen, R. Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica.* **1989**, *19*, 1149–60.
29. Klingenberg, M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *75*, 376–86.
30. Garfinkel, D. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *77*, 493–509.
31. Omura, T.; Sato, R. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: I. EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE. *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 2370–8.
32. Ioannides, C.; Lewis, D.F. Cytochromes P450 in the bioactivation of chemicals. *Curr.Top. Med.Chem.* **2004**, *4*, 1767–88.
33. Oprea, T.I.; Hummer, G.; García, A.E. Identification of a functional water channel in cytochrome P450 enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1997**, *94*, 2133–8.
34. Hasler, J.A.; Estabrook, R.; Murray, M.; Pikuleva, I.; Waterman, M.; Capdevila, J.; Holla, V.; Helvig, Ch.; Falck, R.J.; Farrell, G.; Kaminsky, S.L.; Spivack, D.S.; Boitier, E.; Beaune, P. Human cytochromes P450. *Mol. Aspects. Med.* **1999**, *20*, 1–137.
35. Testa, B.; Krämer, S.D. The biochemistry of drug metabolism-an introduction: Part 2. Redox reactions and their enzymes. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 257–405.
36. Omura, T. Recollection of the early years of the research on cytochrome P450. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* **2011**, *87*, 617–40.
37. Edwards, R.J.; Murray, B.P.; Singleton, A.M.; Boobis, A.R. Orientation of cytochromes P450 in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry.* **1991**, *30*, 71–6.

-
38. Guengerich, F.P. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*. **2000**, *21*, 345–51.
 39. Kousalová, L.; Baranová, J.; Anzenbacher, P. Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – část I. – Interakce na úrovni CYP3A4. *Klin. Farmakol. Farm.* **2003**, *17*, 151–7.
 40. Nebert, D.W.; Wikvall, K.; Miller, W.L. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*. **2013**, *368*, 1–21.
 41. Werck-Reichhart, D.; Feyereisen, R. Cytochromes P450: a success story. *Genome. Biol.* **2010**, *1*, 1–9.
 42. Hrycay, E.G.; Bandiera, S.M. The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *522*, 71–89.
 43. Mrázová, B.: Doktorská disertační práce, PŘF UK, Praha, **2010**.
 44. Guengerich, F. *Cytochrome P450 – Structure, mechanism and biochemistry*, 3rd ed. New York, **2005**.
 45. Waxman, D.J. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *369*, 11–23.
 46. Pelkonen, O.; Turpeinen, M.; Hakkola, J.; Honkakoski, P.; Hukkanen, J.; Raunio, H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch. Toxicol.* **2008**, *82*, 667–715.
 47. Matal, J.; Anzenbacher, P.; Opavský, J. Možné interakce analgetik na úrovni jaterních mikrozomálních cytochromů P450. *Bolest*. **2009**, *12*, 193–201.
 48. Gonzales, F.J. The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. Cyp2e1. *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 1–8.
 49. Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2001**, *58*, 737–47.
 50. Guengerich, F.P.; Shimada, T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, *4*, 391–407.
 51. Porubsky, P.; Meneely, K.; Scott, E. Structures of human cytochrome P-450 2E1. Insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 33698–707.

-
52. Yang, L.; Wu, D.; Cederbaum, A.I. CYP2E1, oxidative stress and MAPK signaling pathways in alcohol-induced hepatotoxicity. *J. Biochem. Pharmacol. Res.* **2014**, *2*, 74–90.
53. Coughtrie, M.W. Function and organization of the human cytosolic sulfotransferase (SULT) family. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *259*, 2–7.
54. James, M.O.; Ambadapadi, S. Interactions of cytosolic sulfotransferases with xenobiotics. *Drug. Metab. Rev.* **2013**, *45*, 401–14.
55. Glatt, H.; Boeing, H.; Engelke, C.E.; Ma, L.; Kuhlow, A.; Pabel, U.; Pomlun, D.; Teubner, W.; Meinl, W. Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. *Mutat. Res.* **2001**, *482*, 27–40.
56. Riches, Z.; Stanley, E.L.; Bloomer, J.C.; Coughtrie, M.W. Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (SULTs) in human tissues: the SULT "Pie". *Drug. Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 2255–61.
57. Wang, L.Q.; James, M.O. Inhibition of sulfotransferases by xenobiotics. *Curr Drug Metab.* **2006**, *7*, 83–104.
58. Glatt, H. Sulfation and sulfotransferases 4: bioactivation of mutagens via sulfation. *FASEB J.* **1997**, *11*, 314–21.
59. Eaton, E.A.; Walle, U.K.; Lewis, A.J.; Hudson, T.; Wilson, A.A.; Walle, T. Flavonoids, potent inhibitors of the human P-form phenolsulfotransferase. Potential role in drug metabolism and chemoprevention. *Drug Metab. Dispos.* **1996**, *24*, 232–7.
60. Chen, Y.; Huang, C.; Zhou, T.; Zhang, S.; Chen, G. Biochanin A induction of sulfotransferases in rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2010**, *24*, 102–14.
61. Glatt, H.; Engelke, C.E.; Pabel, U.; Taubner, W.; Jones, A.L.; Coughtrie, M.W.; Andrae, U.; Falany, C.N.; Meinl, W. Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicol. Lett.* **2000**, *112*, 341–8.
62. Hempel, N.; Gamage, N.; Martin, J.L.; McManus, M.E. Human cytosolic sulfotransferase SULT1A1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2007**, *39*, 685–9.
63. Hollman, P.C.H.; Arts, I.C.W. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1081–93.
64. Hodek, P.; Trefil, P.; Stiborová, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact.* **2002**, *139*, 1–21.

-
65. Birt, D.F.; Hendrich, S.; Wang, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* **2001**, *90*, 157–77.
66. Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035–42.
67. Stapleton, A.E.; Walbot, V. Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiol.* **1994**, *105*, 881–9.
68. Fiscus, E.L.; Booker, F.L. Growth of Arabidopsis flavonoid mutant is challenged by radiation longer than the UV-B band. *Environ. Exp. Bot.* **2002**, *48*, 213–24.
69. Stevenson, D.E.; Hurst, R.D. Polyphenolic phytochemicals-just antioxidants or much more. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2007**, *64*, 2900–16.
70. Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal.* **2013**, 1-17.
71. Rice-Evans, C. Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 797–807.
72. Piskula, M.K.; Yamakoshi, J.; Iwai, Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett.* **1999**, *447*, 287–91.
73. Spencer, J.P.; Chowrimootoo, G.; Choudhury, R.; Debnam, E.S.; Srai, S.K.; Rice-Evans, C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 224–30.
74. Hassig, A.; Liang, W.; Schwabl, H.; Stampfli, K. Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Med. Hypotheses* **1999**, *52*, 479–81.
75. Racek, J.; Holeček, V. Enzymy a volné radikály. *Chem. Listy.* **1999**, *93*, 774–80.
76. Gupta, S.C.; Hevia, D.; Patchva, S.; Park, B.; Koh, W.; Aggarwal, B.B. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid. Redox. Signal.* **2012**, *16*, 1295–322.
77. Waris, G.; Ahsan, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinog.* **2006**, *5*, 1-8.
78. Noroozi, M.; Angerson, W.J.; Lean, M.E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocyte. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *67*, 1210–8.
79. Huang, M.T.; Chang, R.L.; Fortner, J.G.; Conney, A.H. Studies on the mechanism of activation of microsomal benzo[a]pyrene hydroxylation by flavonoids. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 1111–7.
80. Torel, J.; Cillard, J.; Cillard, P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 383–5.

81. Skibola, C.F.; Smith, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *29*, 375–83.
82. Galati, G.; O'Brien, P.J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *37*, 287–303.
83. Manach, C.; Donovan, J.L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Res.* **2004**, *38*, 771–85.
84. Wu, S.; Liu, B.; Zhang, Q.; Liu, J.; Zhou, W.; Wang, C.; Li, M.; Bao, S.; Zhu, R. Dihydromyricetin reduced Bcl-2 expression via p53 in human hepatoma HepG2 cells. *PLoS. One.* **2013**, *8*, 1–7.
85. Hyun, T.K.; Eom, S.H.; Yu, C.Y.; Roitsch, T. Hovenia dulcis-an Asian traditional herb. *Planta Med.* **2010**, *76*, 943–9.
86. Liang, J.; Olsen, R.W.; Alcohol use disorders and current pharmacological therapies: the role of GABA(A) receptors. *Acta Pharmacol. Sin.* **2014**, *35*, 981–93.
87. Du, Q.; Cai, W.; Xia, M.; Ito, Y. Purification of (+)-dihydromyricetin from leaves extract of Ampelopsis grossedentata using high-speed countercurrent chromatograph with scale-up triple columns. *J. Chromatogr.* **2012**, *973*, 217–20.
88. Kou, X.; Chen, N. Pharmacological potential of ampelopsin in Rattan tea. *Food Sci. Hu. Wellness.* **2012**, *1*, 14–8.
89. Zhu, H.; Luo, P.; Fu, Y.; Wang, J.; Dai, J.; Shao, J.; Yang, X.; Chang, L.; Weng, Q.; Yang, B.; He, Q. Dihydromyricetin prevents cardiotoxicity and enhances anticancer activity induced by adriamycin. *Oncotarget.* **2015**, *6*, 3254–67.
90. Hou, X.L.; Tong, Q.; Wang, W.Q.; Shi, C.Y.; Xiong, W.; Chen, J.; Liu, X.; Fang, J.G. Suppression of Inflammatory Responses by Dihydromyricetin, a Flavonoid from Ampelopsis grossedentata, via Inhibiting the Activation of NF-κB and MAPK Signaling Pathways. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1689–96.
91. Zhong, Z.X.; Qin, J.P.; Zhou, G.F.; Chen, X.F. Experimental studies of hypoglycemic action on total flavone of Ampelopsis grossedentata from Guangxi. *Zhongguo. Zhong. Yao. Za. Zhi.* **2002**, *27*, 687–9.
92. Shen, Y.; Lindemeyer, A.K.; Gonzalez, C.; Shao, X.M.; Spigelman, I.; Olsen, R.W.; Liang, J. Dihydromyricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 390–401.

-
93. Chen, S.H.; Zhong, G.S.; Li, A.L.; Li, S.H.; Wu, L.K. Influence of *Hovenia dulcis* on alcohol concentration in blood and activity of alcohol dehydrogenase (ADH) of animals after drinking. *Zhongguo. Zhong. Yao. Za. Zhi.* **2006**, *31*, 1094–6.
94. Liu, B.; Ma, Y.; Yuan, Ch.; Su, C.; Hu, L.; Wang, J. Characterization, stability and antioxidant activity of the inclusion complex of dihydromyricetin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Food Biochem.* **2012**, *36*, 634–41.
95. Guo, Q.; Yuan, J.; Zeng, J.; He, X.; Li, D. Synthesis of dihydromyricetin–manganese (II) complex and interaction with DNA. *J. Mol. Struct.* **2012**, *1027*, 64–9.
96. Hodek, P.; Fousova, P.; Brabencova, E.; Moserova, M.; Pavek, P.; Anzenbacherova, E.; Brotanek, J.; Hudecek, J.; Frei, E.; Stiborova, M. Effect of dihydromyricetin on benzo[a]pyrene activation in rats. *Neuroendocrinol. Lett.* **2014**, *35*, 158–68.
97. Bebova, M.; Bostikova, Z.; Moserova, M.; Pavek, P.; Anzenbacherova, E.; Stiborova, M.; Hodek, P. Modulation of xenobiotic conjugation enzymes by dihydromyricetin in rats. *Monatsh. Chem.* **2017**, (v tisku).
98. Huang, Y.; Xu, Z.; Ye, Q. Effect of Dihydromyricetin on Cytochrome P450 Isoforms CYP1A2, CYP2C9 and CYP3A4 in Rats. *Lat. Am. J. Pharm.* **2013**, *32*, 1570–4.
99. Bostikova, Z.; Moserova, M.; Pavek, P.; Stiborova, M.; Hodek, P. Role of dihydromyricetin in cytochrome P450-mediated metabolism and carcinogen activation. *Neuroendocrinol. Lett.* **2015**, *36*, 46–52.
100. Zhang, Y.; Que, S.; Yang, X.; Wang, B.; Qiao, L.; Zhao, Y. Isolation and identification of metabolites from dihydromyricetin. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 909–16.
101. Nöthlings, U.; Murphy, S.P.; Wilkens, L.R.; Henderson, B.E.; Kolonel, L.N. Flavonols and pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study. *Am. J. Epidemiol.* **2007**, *166*, 924–31.
102. Flamini, R.; Mattivi, F.; De Rosso, M.; Arapitsas, P.; Bavaresco, L. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 19651–69.
103. Li, C.; Lim, S.C.; Kim, J.; Choi, J.S. Effects of myricetin, an anticancer compound, on the bioavailability and pharmacokinetics of tamoxifen and its main metabolite, 4-hydroxytamoxifen, in rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2011**, *36*, 175–82.

104. Shin, J.C.; Jung, H.Y.; Harikishore, A.; Kwon, O.D.; Yoon, H.S.; Kim, K.T; Choi, B.H. The flavonoid myricetin reduces nocturnal melatonin levels in the blood through the inhibition of serotonin N-acetyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *440*, 312–6.
105. Hanski, L.; Genina, N.; Uvell, H.; Malinovskaja, K.; Gylfe, A.; Laaksonen, T.; Kolakovic, R.; Mäkilä, E. Inhibitory activity of the isoflavone biochanin A on intracellular bacteria of genus Chlamydia and initial development of a buccal formulation. *PLoS. One* **2014**, *9*, 1–27.
106. Srinivas, N.R. Biochanin a: understanding the complexities in the paradoxical drug-drug interaction potential. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2015**, *40*, 119–25.
107. Moon, Y.J; Morris, M.E. Pharmacokinetics and bioavailability of the bioflavonoid biochanin A: effects of quercetin and EGCG on biochanin A disposition in rats. *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 865–72.
108. Peirson, S.N.; Butler, J.N. RNA extraction from mammalian tissues. *Methods Mol. Biol.* **2007**, *362*, 315–27.
109. GENEzol™ Reagent Protocol, dostupné na:
<http://www.geneaid.com/sites/default/files/GZR8.pdf> [cit. 29.4.2017]
110. TRIzol Reagent Protocol, dostupné na:
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf
[cit. 29.4.2017]
111. Lee, P.Y.; Costumbrado, J.; Hsu, C.Y.; Kim, Y.H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J. Vis. Exp.* **2012**, *62*, 1-5.
112. Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker dostupné na:
http://www.biomart.cn/upload/asset/attachment/fermentas%E4%B8%AD%E5%9B%BD/coa_sm0192.pdf [cit. 29.4.2017]
113. <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2007/11/pdb.ip47.full> [cit. 29. 4. 2017]
114. Herschhorn, A.; Hizi, A. Retroviral reverse transcriptases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 2717–47.
115. Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **2000**, *25*, 169–93.

116. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit dostupné na:
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/4375222_HighCap_cDNA_ReverseTranscriptKits_PL.pdf [cit. 29.4.2017]
117. Dudová, S.; Hájek, R. Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie*. **2008**, *21*, 220–22.
118. Wong, M.L.; Medrano, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. **2005**, *39*, 75–85.
119. TaqMan[®] Gene Expression Master Mix Protocol, dostupné na:
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_039284.pdf
[cit. 29.4.2017]
120. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2003–7.
121. Wiechelman, K.; Braun, R.D.; Fitzpatrick, J.D. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* **1988**, *175*, 231–7.
122. Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit dostupné na:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23252> [cit. 26. 6. 2017]
123. <http://www.corning.com> [cit. 26. 6. 2017]
124. Zhang, Y.S.; Zhang, Q.Y.; Li, L.Y.; Wang, B.; Zhao, Y.Y.; Guo, D.A. Simultaneous determination and pharmacokinetic studies of dihydromyricetin and myricetin in rat plasma by HPLC-DAD after oral administration of Ampelopsis grossedentata decoction. *J. Chromatogr B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *860*, 4–9.
125. Bébová, M.: Rigorozní práce, PřF UK, Praha, **2017**.
126. Boštíková, Z.: Diplomová práce, PřF UK, Praha, **2016**.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů

[illegible]